METABOLITE PROFILING DAN UJI AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI *N*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) SECARA *IN SILICO*

SKRIPSI

Oleh :

RICKY ARIE JATMIKO

NIM. 16670005

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2020

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

METABOLITE PROFILING DAN UJI AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI *N*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) SECARA *IN SILICO*

SKRIPSI

Diajukan Kepada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)

Oleh:
RICKY ARIE JATMIKO
NIM. 16670005

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2020

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

METABOLITE PROFILING DAN UJI AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMASI FRAKSI *N*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) SECARA *IN SILICO*

SKRIPSI

Oleh:

RICKY ARIE JATMIKO
NIM. 16670005

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 3 Juni 2020

Pembimbing I	Pembimbing II
apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm	Dewi Sinta Megawati, M.Sc.
NIP. 19900221 201801 1 001	NIP. 19840116 20170101 2 125

Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi

apt. Ahmad Hanapi, M.P.I, M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

METABOLITE PROFILING DAN UJI AKTIVITAS ANTINEUROINFLAMSI FRAKSI *N*-HEKSANA DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) SECARA *IN SILICO*

SKRIPSI

Oleh:

RICKY ARIE JATMIKO
NIM. 16670005

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)
Tanggal: 3 Juni 2020

Ketua Penguji	**: Dewi Sinta Megawati, M.Sc.** **NIP. 19840116 20170101 2 125**	.....
Anggota Penguji	**: apt. Rahmi Annisa, M.Farm** **NIP. 19890416 20170101 2 123**	.....
	: apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm **NIP. 19900221 201801 1 001**	.....
	: apt. Hajar Sugihantoro, M.P.H **NIP. 19851216 201903 1 008**	.....

Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi

apt. Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERTANYAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ricky Arie Jatmiko

NIM : 16670005

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Skripsi : *Metabolite Profiling* Dan Uji Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi *N*-Heksana Daun Semanggi (*Marsilea Crenata* C Presl.) Secara *In Silico*

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar rujukan. Apabila di kemudian hari terbukri atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Malang, 3 Juni 2020

Yang membuat pernyataan,

METERAI TEMPEL
TGL. 20
F236FADF948957463
6000
ENAM RIBU RUPIAH

Ricky Arie Jatmiko
NIM. 16670005

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

MOTTO

"Hidup Itu Mudah Cuma Kita Yang Menyusahkan"

"If you don't take risks, you can't create a future"

"Terkadang orang yang tak terduga adalah orang yang bisa melakukan sesuatu diluar dugaan"

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

LEMBAR PERSEMBAHAN

Alhamdulillah dengan senantiasa memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT beserta shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW sehingga bisa terselesainya skripsi ini.

Terkadang hidup membutuhkan perjuangan yang sangat keras dan semua ini dapat dilalui dengan penuh semangat pantang menyerah walaupun telah jatuh berkali-kali semoga ilmu yang didapat bermanfaat untuk semuannya.

Dengan rasa syukur yang mendalam, penulis persembahkan tulisan karya sederhana ini kepada kedua orang tua, keluarga, sahabat, teman- teman dan seluruh orang terdekat yang turut andil membantu mendoakan, memberikan semangat, motivasi dan dorongan agar segera menyelesaikan skripsi ini sehingga memperoleh gelar Sarjana Farmasi. Semoga Allah membalas segala kebaikan kalian dengan sebaik- baiknya balasan. Aamiin.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan pada kehadirat Allah SWT yang telah memberi rahmat dan hidayahnya-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi. Karya tulis ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian Sarjana Farmasi, Program Studi Farmasi di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Skripsi ini bisa terselesaikan tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah banyak memberikan pengetahuan dan pengalaman yang berharga.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P.W, M.Kes, Sp. B., Sp.Rad(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. apt. Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm selaku ketua program studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm dan Ibu Dewi Sinta Megawati, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan arahan. Bimbingan, dan motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik
5. Ibu apt. Rahmi Annisa, M.Farm selaku penguji utama skripsi dan Bapak apt. Hajar Sugihantoro, M.P.H selaku penguji agama skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan masukan kepada penulis.
6. Segenap sivitas akademika Program Studi Farmasi terutama seluruh dosen yang telah memberikan ilmu yang tidak terbatas selama kuliah di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

7. Orang tua tercinta, Bapak Anam Widodo dan Ibu Rutik Eko Prasetyowati dan kakak saya Ricko Arie Jatmiko, yang senantiasa memberikan doa, semangat kepada penulis dalam menuntut ilmu.
8. Keluarga tercinta, kakek Wadi Mangku Siswo dan nenek Kasiati dan Jeni, om saya Anang Eko Purnomo dan Dedy Purnomo serta kedua tante saya Indah dan Ummah serta sepupu saya Fawwas, Farel, Nayla, Kamila, Aira dan Dhamar yang senantiasa memberikan doa, semangat kepada penulis.
9. Teman teman proyek Fitoestrogen angkatan 2014, 2015, 2016 dan 2017 yang selalu memberi dukungan dan kerja sama.
10. Semua rekan-rekan farmasi yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis, "Farmasyifa", Teman-teman sobat buncis, teman seperjuangan organisasi hmj Habbatussauda' 2017 dan 2018 serta sema FKIK 2019.
11. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu namun telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung.
12. Barisan para mantan dan semua yang pergi tanpa sempat aku miliki tak satupun yang aku sesali hanya membuatku semakin terlatih.

Penulis menyadari bahwa di dalam skripsi masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, namun penulis tetap berharap semoga skripsi ini bisa bermanfaat kepada para pembaca, khususnya bagi penulis secara pribadi. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik-kritik yang dapat menyempurnakan karya ini.

Malang, 3 Juni 2020

Penulis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL

HALAMAN PENGAJUAN

HALAMAN PERSETUJUAN

HALAMAN PENGESAHAN

HALAMAN PERNYATAAN

MOTTO

HALAMAN PERSEMBAHAN

KATA PENGANTAR i

DAFTAR ISI iii

DAFTAR TABEL vi

DAFTAR GAMBAR vii

DAFTAR SINGKATAN viii

ABSTRAK ix

ABSTRACK x

مستخلص البحث xi

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang 1

1.2. Rumusan Masalah 5

1.3. Tujuan Penelitian 5

1.3.1 Tujuan Umum 5

1.3.2 Tujuan Khusus 5

1.4. Manfaat Penelitian 5

1.5. Batasan Penelitian 6

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan *M. crenata* 8

2.2.1 Klasifikasi *M. crenata* 8

2.2.2 Morfologi *M. crenata* 8

2.2.3 Kandungan dan Manfaat *M. crenata* 9

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.2. Tinjauan Ekstraksi 9
2.2.1 Ekstraksi *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) 10
2.2.2 Ekstraksi Cair-Cair 12
2.3. Tinjauan Pelarut 13
2.4. *Metabolite Profiling* 14
2.5. UPLC-QToF-MS/MS 15
2.6. Metode *In Silico* 22
2.7. *Software* Penunjang 23
2.7.1 MassLynx 23
2.7.2 Chemspider 23
2.7.3 Chemdraw 24
2.7.4 SwissADME 25
2.7.5 Avogadro 26
2.7.6 AutoDock Vina 27
2.7.7 Discovery Studio Visualizer 28
2.8. Tinjauan Neurodegeneratif 29
2.9. Tinjauan Neuroinflamasi 29
2.10.Tinjauan Fitoestrogen 30
2.11.Tinjauan Estrogen Reseptor Beta (ER-β) 32
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL
3.1. Kerangka Konseptual 34
3.2. Uraian Kerangka Konseptual 35
3.3. Hipotesis 35
BAB IV METODE PENELITIAN
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian 36
4.2. Waktu dan Tempat 36
4.3. Sampel Penelitian 36
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional 37
4.4.1 Variabel Bebas 37
4.4.2 Variabel Tergantung 37
4.4.3 Definisi Operasional Variabel 37

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.5. Alat dan Bahan Penelitian 38
4.5.1 Alat Penelitian 38
4.5.2 Bahan Penelitian 38
4.6. Prosedur Penelitian 39
4.6.1 *Metabolite Profiling* 39
4.6.2 Uji *In Silico* 39
4.7. Skema Penelitian 41

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbandingan antara HPLC dengan UPLC 17

Tabel 4.1 Spesifikasi Instrumen UPLC-QToF-MS/MS 37

Tabel 5.1 Interpretasi Hasil Kandungan Senyawa Fraksi *n*-Heksana Daun *M. crenata* dengan UPLC-MS 46

Tabel 5.2 Hasil Validasi Internal Autodock Vina 53

Tabel 5.3 Senyawa yang memenuhi kriteria TPSA dan *BBB Permeant* 54

Tabel 5.4 Hasil Analisis *In Silico* 57

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Semanggi (*M. crenata*) 7

Gambar 2.2 Proses mekanisme ekstraksi UAE 10

Gambar 2.3 Proses terjadinya ekstraksi menggunakan metode UAE 11

Gambar 2.4 Skema pengoperasian UPLC 15

Gambar 2.5 Bagan Instrumen Q-ToF-MS/MS 19

Gambar 2.6 Tampilan Software MassLynk 22

Gambar 2.7 Tampilan website ChemSpider 23

Gambar 2.8 Tampilan Software Chem Draw 24

Gambar 2.9 Tampilan website swissADME 25

Gambar 2.10 Tampilan Avogadro saat optimasi struktur senyawa 26

Gambar 2.11 Tampilan Autodockvina saat proses autogrid 27

Gambar 2.12 Tampilan Discovery Studio Visualizer saat analisis senyawa 28

Gambar 2.13 Struktur (a) Asam palmitat (b) Daidzein dan (c) Genestein 31

Gambar 2.14 Struktur 17β-estradiol 33

Gambar 5.1 Hasil Kromatogram Fraksi *n*-Heksana Daun *M. crenata* 44

Gambar 5.2 Protein 3OLS dengan ligand 17β-estradiol 53

Gambar 5.3 Optimasi Geometri Senyawa Uji 55

Gambar 5.4 Hasil Interaksi Gugus Farmakofor 56

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR SINGKATAN

α : Alfa

β : Beta

Å : Angstrom

cm: Centimeter

°C: derajat celsius

°F: derajat fahrenheit

kHz: kilo herzt

UAE: *Ultrasonic Assisted Extraction*

ER-β: Estrogen Receptor beta

..%: Persen

PDB: *Protein Data Bank*

TPSA: *Topological Polar Surface Area*

BBB: *Blood Brain Barrier*

UPLC QToF: *Ultra Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight*

NF-κB : *Nuclear Factor* Kappa B x

mg: miligram

µL: mikroliter

mL: mililiter

SPE: *Solid Phase Extraction*

ESI*: Electrospray ionization* (ESI)

RMSD: *Root Mean Square Deviation* (RMSD)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRAK

Jatmiko, R. A. 2020. *Metabolite Profiling* dan Uji Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi *N*-Heksana Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C Presl.*)* Secara *In Silico*. Skripsi. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: apt. Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm. ; Pembimbing II: Dewi Sinta Megawati, M.Sc. Penguji: Rahmi Annisa, M.Farm., Apt.
Pembimbing: (1) Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm., Apt.

(2) Dewi Sinta Megawati, M.Sc.

Neurodegeneratif merupakan kondisi patologis dimana sel syaraf mengalami kehilangan struktur atau fungsi. Salah satu obat untuk mengatasi penyakit ini adalah senyawa fitoestrogen. Senyawa fitoestogen merupakan senyawa yang memiliki sifat dan khasiat yang sama dengan hormon estrogen. Salah satu tumbuhan yang diketahui mengandung fitoestrogen adalah Semanggi (M*arsilea crenata* C. Presl). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil metabolit fraksi *n*-Heksana dari daun *M. crenata* menggunakan UPLC-QToF-MS/MS, dan memprediksi aktivitas antineuroinflamasi dari metabolit yang memiliki aktivitas sama dengan 17β-estradiol menggunakan penambatan molekular. Sampel fraksi *n*-Heksana dari daun *M. crenata* diinjeksikan ke dalam UPLC-QToF-MS / MS, dan kemudian dianalisis dengan perangkat lunak Masslynx 4.1 untuk menentukan rumus molekul senyawa, untuk penentuan nama dan struktur senyawa menggunakan website chemspider. Penambatan molekular dilakukan pada senyawa dengan Autodock 4.2.6. Hasil profil metabolit fraksi *n*-Heksana dari daun *M. crenata* menunjukkan ada 39 senyawa. Dari hasil 39 senyawa, 25 senyawa dapat diidentifikasi, sedangkan 14 senyawa tidak diketahui. Pada hasil in silico terdapat 5 senyawa yang memiliki ikatan agonis dengan protein 3OLS yang diprediksi memiliki aktivitas antineuroinflamasi yaitu 6-Chloro-9,10-dimethyl-12-oxatricyclo [5.3.2.01,6] dodec-4-yl acetate; Piperine; 2-Ethyl-N-{[5-(4-ethyl-1-piperazinyl)-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl] methyl}-N-(3-methoxypropyl) hexanamide; Mestanolone dan Dioctylamine.

Kata kunci: *M.crenata*, Fitoestrogen, *Metabolite profiling*, Antineuroinflamasi, *In silico*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRACT

Jatmiko, R. A. 2020. Metabolite Profiling and Antineuroinflammation Activity Test of *N*-Heksana Fraction of *Marsilea crenata* C Presl. Leaves In Silico. Thesis. Pharmacy Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: apt. Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm. ; Advisor II: Dewi Sinta Megawati, M.Sc. Examiner: apt. Rahmi Annisa, M.Farm.

Neurodegenerative is a patological condition in which neuron cell loses its structure or function. One way to solve the problem is by using fitoestrogen compound. It has similar properties and function as estrogen hormone. One of plants having fitoestrogen is M*arsilea crenata* C. Presl. The study aims to find out the metabolite pofile of *n*-Heksana fraction of *M. crenata* leaves using UPLC-QToF-MS/MS, and to predict antineuroinflammation of metabolite which has similar activity with 17β-estradiol using molecular fixation. The samples of *n*-Heksana fraction of *M. crenata* leaves are injected into UPLC-QToF-MS / MS, and analyzed using Masslynx 4.1 software to determine the compound molecule formula. Meanwhile, to determine the name and structure of the compound the researcher employs chemspider website. Molecular fixation is done on the compounds using Autodock 4.2.6. The result of metabolite profile of *n*-Heksana fraction of *M. crenata* leaves show that it has 39 compounds. From the total compounds, 25 compounds can be identified and 14 compounds are unidentified. The result of in silico test shows that 5 compounds have agonist bond with protein 3OLS which is predicted having an antineuroinflammation activity. They are 6-Chloro-9,10-dimethyl-12-oxatricyclo [5.3.2.01,6] dodec-4-yl acetate; Piperine; 2-Ethyl-N-{[5-(4-ethyl-1-piperazinyl)-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl] methyl} -N-(3-methoxypropyl) hexanamide; Mestanolone and Dioctylamine.

Keywords: *M.crenata*, Fitoestrogen, *Metabolite profiling*, Antineuroinflammation, *In silico*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

مستخلص البحث

جاتميكو، ر. أ.، ٢٠٢٠، **تنميط المستقلبة و اختبار نشاط مضادة الالتهاب العصبي من ن هكسان لورقة سرخس (Marsilea crenata C Presl) في السيليكو**. البحث الجامعي، قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: برهان معارف، الماجستير. المشرف الثاني: ديوي سينتا ميغاواتى، الماجستيرة. المستشار: رحمي أنيسة، الماجستيرة.

الكلمات الرئيسية: السراخس، فيتواستروجين، تنميط المستقلبة، مضادة الالتهاب العصبي، في السيليكو.

التنكس العصبي هو حالة مرضية مما تعاني الخلايا العصبية من فقدان بنيتها أو وظيفتها. من إحدى الأدوية للتعامل مع هذا المرض هو مركب فيتواستروجين. فهو المركب الذي له الصفات و الخصائص المتماثلة مع هرمون الاستروجين. ونبات السرخس (Marsilea crenata C. Presl) هو من النباتات التي تحتوي على فيتواستروجين. يهدف هذا البحث إلى معرفة تنميط مستقلبة ن-هكسان لورقة سرخس باستخدامUPLC-QToF-MS/MS ، و التنبؤ بنشاط مضادة الالتهاب العصبي التي لها نفس النشاط مع β-estradiol 17 من خلال الربط الجزيئي. تم اختناق عينة ن هكسان من ورقة السرخس فيUPLC-QToF-MS/MS ، ومن ثم قام بتحليلها عن طريق برنامج Masslynx 4.1 لتحديد الصيغة الجزيئية للمركب. وأما لتحديد اسم وهيكل المركب فاستخدم موقع إلكتروني .chemspider ويتم إجراء الربط الجزيئي على مركبات باستخدام .Autodock 4.2.6 أظهرت نتائج تنميط مستقلبة ن هكسان من ورقة السرخس ٣٩ مركبا. ومن ذلك العدد يمكن تحديد ٢٥ مركبا، في حين أن ١٤ مركبا غير معروف. في نتائج السيليكو هناك ٥ مركبات التي لها أثناب الترابط مع البروتين OLS3، حيث يتوقع منها امتلاك نشاط مضادة الالتهاب العصبي؛ منها :

٦ – كلورو – ٩. ١٠ – ثنائي ميثيل – ١٢ – أوكساتريجيجلو [٥،٣،٢،٠١،٦] دوديك – ٤ – ي ل أسيتات؛ بيبيرين؛ ٢ – إيثيل – ن – {[٥ – (٤ – إيثيل – ١هـ – فيرازول – ٤ – ي ل] ميثيل} – ن – (٣ – ميتوكسي بروبيل) هكسان الأكسدة؛ ميستانولون و ديوكتيلامين.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause adalah proses biologis yang terjadi sebagai bagian dari penuaan pada wanita. Menopause menghasilkan keadaan defisiensi estrogen, dengan frekuensi dan keparahan bervariasi secara signifikan di antara wanita (Lee *et al.*, 2013). Defisiensi hormon estrogen dapat menyebabkan penyakit neurodegeneratif yang secara istilah didefinisikan sebagai gangguan hilangnya neuron yang selektif dan keterlibatan yang berbeda dari sistem fungsional sehingga menyebabkan terjadinya neuroinflamasi (Kovacs, 2010).

Secara spesifik, neuroinflamasi pada sistem syaraf dapat muncul karena kenaikan mikroglia teraktivasi (Matt and Johnson, 2015). Secara genetik, kenaikan mikroglia teraktivasi ini sendiri dapat muncul karena terjadinya defisiensi estrogen pada wanita yang telah memasuki masa pascamenopause (Lee *et al.*, 2013). Saat mengalami defisiensi estrogen, maka *estrogen receptor* (ER) tidak dapat menangkap estrogen yang diproduksi oleh tubuh sehingga terjadi penurunan jumlah ER teraktivasi salah satunya pada sistem syaraf pusat. Akibatnya terjadi peningkatan aktivitas *nuclear factor kappa-beta* (Nf-κB) yang mempengaruhi sintesis protein sehingga menyebabkan neuroinflamasi (Villa *et al.*, 2016).

Terapi yang biasa digunakan untuk mengatasi defisiensi hormon estrogen adalah terapi sulih hormon, tetapi terapi sulih hormon memiliki efek samping dapat meningkatkan resiko kanker payudara (Agarwal *et al.*, 2018). Terapi terbaru untuk mengatasi terjadinya defisiensi estrogen yang diajukan untuk mengganti terapi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sulih hormon karena memiliki tingkat keamanan lebih tinggi adalah dengan penggunaan senyawa fitoestrogen yang terdapat dalam senyawa tumbuhan (Alldredge *et al*., 2013). Fitoestrogen diharapkan berkhasiat neuroprotektif. Neuroproktektif adalah suatu mekanisme yang digunakan untuk melindungi atau mengurangi kerusakan syaraf pada sisitem syaraf pusat (SSP) yang disebabkan oleh penyakit neurodegeneratif (Katzung, 2002).

Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa yang terdapat dalam tumbuhan tersebut merupakan suatu usaha dalam menemukan obat baru. Hal ini merupakan salah satu contoh implementasi Al-Qur'an dalam kehidupan di bumi. Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara Ayat 7 yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: *Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik (Asy Syu'ara': 7).*

Tafsir kata *awalan yarouu ilaa* menunjukkan pada manusia untuk memaksimalkan potensi yang dimiliki dengan cara memperhatikan apa-apa yang tumbuh di bumi dan mengkaji manfaat tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Kata *zaujiin kariim* berasal dari kata *zaujin* yang berati pasangan dan *karim* yang berarti baik. Kata pasangan (*zauj*) merupakan pasangan tumbuhan dengan beragam jenisnya yang tumbuh subur dan memiliki manfaat, sedangkan kata baik (*karim*) merupakan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Ayat ini menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan beragam tumbuhan yang bermanfaat di muka bumi ini untuk diambil manfaat darinya (Shihab, 2002).

M. crenata adalah memiliki kandungan fitokimia berupa gula pereduksi, steroid, kandungan karbohidrat, dan flavonoid. Kandungan flavonoid pada tanaman ini juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiradang, antitumor, dan mencegah osteoporosis (Yacoeb *et al.*, 2010). *M. crenata* memiliki kandungan mineral dalam daun dan batang yaitu kalium, fosfor, zat besi, natrium, kalium, fosfor, zat besi, natrium, kalsium, seng, dan tembaga (Ma'arif, 2016). *M. crenata* juga mengandung *phytochemical* seperti alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino (Trisunuwati, 2017). Pada penelitian ini menggunakan pelarut *n*-Heksana berdasarkan penelitian sebelumnya penggunaan pelarut *n*-Heksana serta instrumen GC-MS diketahui bahwa *M. crenata* memiliki kandungan senyawa kelompok volatil seperti monoterpenoid dan diterpenoid, dan senyawa kelompok asam lemak yang diketahui mengandung fitoestrogen (Ma'arif, 2016).

Metabolite sekunder dapat diidentifikasi menggunakan berbagai cara, salah satunya dengan *Ultra Performance Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight - Mass Spectrometry* (UPLC-QToF-MS/MS) untuk mengetahui kandungan senyawa dalam fraksi *n*-Heksana *M .crenata*. Instrumen ini memiliki banyak keunggulan, antara lain dapat meningkatkan efisiensi pemisahan senyawa, mempercepat waktu analisis, mampu memisahkan senyawa yang lebih kecil, mengurangi jumlah sampel yang dibutuhkan (Naushad dan Khan, 2014), pengukuran massa monoisotop yang lebih akurat, spektra resolusi tinggi untuk

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

konfirmasi senyawa target dan senyawa yang tidak diketahui serta memperoleh hasil yang lebih cepat tanpa menurunkan kualitas resolusi massa yang tinggi (Zhang *et al.*, 2015). Salah satu cara untuk mengamati aktivitas dari senyawa hasil senyawa hasil *metabolite profiling* adalah menggunakan metode *in silico* (Wadood *et al*., 2013).

In Silico merupakan sebuah metode dengan bantuan perangkat komputer yang dikembangkan dan diterapkan secara luas dan salah satunya untuk membantu pengembangan dalam bidang farmakologi (Ekins *et al*., 2007). Pendekatan *In silico* memberikan keunggulan, diantaranya membutuhkan waktu yang singkat, murah serta dapat menjelaskan secara jelas mekanisme yang mungkin terjadi ketika suatu senyawa bahan alam masuk ke dalam tubuh (Wadood *et al*., 2013; Sliwoski *et al*., 2014). Penelitian menggunakan metode *in silico* telah dilakukan pada prediksi aktivitas anti neuroinflamasi pada *M. crenata* etanol 96%, hasilnya terdapat senyawa yang dapat memiliki aktivitas anti neuroinflamasi (Ma'arif, 2019). Setelah dilakukan uji pendahuluan dilakukan uji in vitro dan hasilnya memiliki aktivitas anti neuroinfalamsi, sehingga penelitian pendahuluan dengan *in silico* prediksinya mendekati benar (Mirza, 2019).

Pendekatan *in silico* dilakukan dengan *Molecular docking* (penambatan molekul), dapat didefinisikan sebagai masalah optimasi yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu (Mukesh dan Kumar, 2011). Tujuan dari *molecular docking* adalah untuk pemodelan struktur dan memprediksi aktivitasnya, selain itu juga untuk meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi target aksinya pada uji secara *in vitro* (Kitchen, 2004). Energi ikatan hasil docking merupakan parameter utama untuk

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

mengetahui kestabilan antara ligan dan protein, sehingga semakin rendah nilai *binding afinity* maka interaksi ligan reseptor semakin stabil (Arwansyah *et al*., 2014).

Protein yang digunakan adalah 3OLS karena merupakan salah satu protein reseptor ERβ dan berperan dalam regulasi homoestasis sel (Villa *et al*., 2016; Muchtaridi *et al*., 2018). Senyawa yang diinginkan dapat menggantikan 17β-estradiol yang merupakan estrogen yang beredar utama serta bentuk estrogen yang paling kuat. 17β-estradiol diproduksi oleh ovarium dan kelenjar adrenal, dan beredar di seluruh tubuh. 17β-estradiol terbukti dapat bertindak sebagai neuroprotektif (Rettberg *et al*., 2013).

Berdasarkan latar belakang perlu dilakukan penelitian mengenai *metabolite profiling* dalam fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* menggunakan UPLC-QToF/MS/MS, serta uji *in silico* hasil *metabolite profiling* yang terfokus pada ikatan agonis. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun *M. crenata* dan interaksi antara senyawa hasil *metabolite profiling* dengan protein 3OLS secara agonis, sehingga dapat memberikan data-data ilmiah yang dapat dijadikan acuan untuk penelitian lebih lanjut agar bermanfaat pada penggunaannya sebagai tumbuhan obat.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana senyawa hasil *metabolite profiling* dari fraksi *n*-Heksana pada daun *M. crenata* dengan UPLC-QToP-MS/MS?

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2. Apakah terdapat senyawa fitoestrogen yang memiliki khasiat neuroprotektif pada fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata*?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum pada penelitian ini adalah mengetahui prediksi khasiat neuroprotektif pada fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata.*

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisa senyawa hasil *metabolite profiling* dari fraksi *n*-Heksana pada daun *M. crenata* dengan UPLC-QToP-MS/MS.
2. Memprediksi senyawa fitoestrogen yang memiliki khasiat neuroprotektif pada fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah mengetahui prediksi kandungan fitoestrogen pada fraksi *n*-Heksana pada daun *M. crenata* sehingga dapat dikembangkan sebagai obat baru yang bersifat neuroprotektif serta sebagai data acuan untuk dilanjutkan pada uji *in vitro*.

1.5 Batasan Penelitian

1. Tumbuhan semanggi yang digunakan adalah bagian daun yang diperoleh dari Benowo Surabaya Jawa Timur.
2. Pendeskripsian hasil *metabolite profiling* menggunakan UPLC-QToP-MS/MS.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3. Protein yang digunakan dalam simulasi berbasis komputer adalah protein *XRay* dengan id protein 3OLS dari RCSB.
4. Software yang digunakan adalah Mass Lynx, ChemDraw 15, Avogadro, Biovia Discovery Studio 2016 *Visualizer*, dan *Autodock* vina.
5. Software online yang digunakan adalah Chemspider dan SwissAdme.
6. Interaksi antara ligan dan reseptor yang diamati adalah ikatan agonis.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *M. crenata*

2.1.1 Klasifikasi *M. crenata*

Gambar 2.1 Tanaman Semanggi (*M. crenata*)

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Divisi : Pteridophyta
Kelas : Pteridopsida
Ordo : Salvinales
Famili : Marsileaceae
Genus : Marsilea
Species : *Marsilea crenata* C Presl.
(Afriastini, 2003)

2.1.2 Morfologi *M. crenata*

Tumbuhan *M. Crenata* tumbuh merambat pada lingkungan perairan dengan tangkai mencapai 20 cm serta bagian yang muncul ke permukaan air setinggi 3-4 cm. Daun *M. crenata* memiliki 4 helai anak daun dengan ukuran rata-rata panjang 2,5 cm dan lebar 2,3 cm. Daunnya tipis dan lembut berwarna hijau gelap. Akar pada tanaman *M. crenata* tertanam dalam substrat di dasar perairan. *Sporocarps* yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

merupakan struktur reproduksi berbentuk panjang dan bulat pada bagian ujung, terdapat sebanyak 1 sampai 6 buah dengan ukuran 3-4 mm, dan panjang tangkai *sporocarps* 5 mm. Tangkai pada *sporocarps* tidak bercabang, di ujung yang berbentuk melingkar terdapat seperti gigi kecil dan ditutupi dengan rambut *caducous* berhimpitan dan tegak lurus dengan tangkai (Afriastini, 2003).

2.1.3 Kandungan dan Manfaat *M. crenata*

Daun dan batang *M crenata* mengandung saponin dan polifenol (Herlina, 2011). Yacoeb, *et al.* (2010) menyatakan bahwa pada *M. crenata* segar terdapat kandungan fitokimia berupa gula pereduksi, steroid, kandungan karbohidrat, dan flavonoid. Kandungan flavonoid pada tanaman ini juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiradang, antitumor, dan mencegah osteoporosis. Masyarakat Jawa memanfaatkan daun *M crenata* muda sebagai bahan pangan. *M crenata* muda banyak digunakan sebagai campuran pecel di daerah Surabaya. Pemanfaatan *M. crenata* tidak hanya sebagai bahan pangan saja, daun dan batang semanggi juga dapat digunakan sebagai peluruh air seni (Afriastini 2003). *M. crenata* memiliki kandungan mineral dalam daun dan batang yaitu kalium, fosfor, zat besi, natrium, kalium, fosfor, zat besi, natrium, kalsium, seng, dan tembaga. *M. crenata* juga mengandung *phytochemical* seperti alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino. Kandungan mineral dan *phytochemical* yang berfungsi sebagai kristal kalsium oksalat adalah kalium dan flavonoid (Trisunuwati, 2017).

2.2 Tinjauan Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

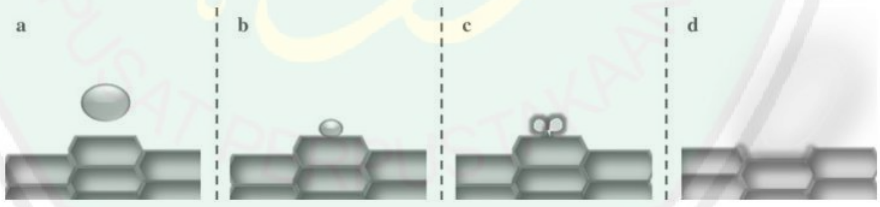
kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhriani, 2014). Ekstraksi melibatkan banyak perubahan, baik perubahan fisika maupun perubahan kimia yang menyangkut perubahan structural terhadap bahan. Untuk memperbaiki kualitas proses ekstraksi dapat dilakuakn dengan memperhatikan sifat-sifat fisika dan kimia dari bahan yang hendak diekstraksi (Wonorahardjo, 2013).

2.2.1 Ekstraksi *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

Ekstraksi ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-20.000 kHz (Banu dan Catherine, 2015). Prinsip kerja dari ekstraksi ini yaitu meningkatkan permeabilitas dinding sel dengan daya kavitasi sebagai stress dinamik sehingga timbul fraksi interfase (Ma'arif, 2012; Medina-Torres *et al*., 2017). Mekanisme yang terjadi yaitu intensifikasi massif transfer massa dan laju kecepatan pelarut ke bahan sel dari bagian tanaman. Mekanisme ekstraksi oleh ultrasonik melibatkan dua jenis fenomena fisika yaitu difusi di dinding sel dan pembilasan isi sel setelah memecahkan dinding. Kadar air sampel, tingkat penggilingan, ukuran partikel dan pelarut merupakan faktor yang sangat penting untuk memperoleh ekstraksi yang efisien dan efektif. Selain itu, suhu, tekanan, frekuensi dan waktu sonikasi adalah faktor yang juga mempengaruhi kerja *ultrasonic assisted extraction* (UAE). UEA juga telah digabungkan dengan berbagai teknik klasik untuk meningkatkan efisiensi sistem konvensional. Dalam unit ekstraksi pelarut, perangkat ultrasonik ditempatkan pada posisi yang tepat untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi (Azmir *et al*., 2013).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

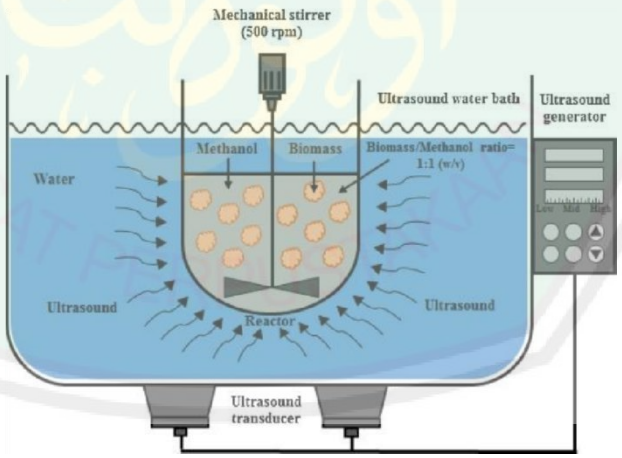
Metode ekstraksi UAE memiliki faktor penentu keberhasilan diantaranya adalah ukuran partikel ekstrak, moisture content bahan dan pelarut yang digunakan (Ngaha Njila *et al*., 2017). *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) memiliki kekuatan kavitasi akustik sebagai kekuatan pendorong utama yang mampu menginduksi serangkaian kompresi dan *rarefactions* dalam molekul pelarut, sehingga menyebabkan pembentukan gelembung sebagai akibat dari perubahan suhu dan tekanan (Chemat *et al*., 2008). Proses terjadinya mekanisme ekstraksi metode ini diawali dengan terjadi perambatan gelombang ultrasonik yang menghasilkan fenomena kavitasi. Selanjutnya timbul gaya gunting yang cukup tinggi sehingga muncul gelembung yang dapat mengurangi ukuran dari senyawa yang akan diambil dan memperlebar pori permukaan dari bahan. Peristiwa ini akhirnya dapat menyebabkan terjadinya aliran yang deras dari senyawa untuk keluar dari bahan yang diekstraksi (Vilkhu *et al*., 2008). Proses mekanisme ini dapat diamati pada gambar 2.2 (Esclapez *et al*., 2011):



Gambar 2.2 Proses mekanisme ekstraksi UAE (a) Gelembung cavitasi mendekati dinding sel. (b) Gelembung cavitasi berusaha membuat pori pada dinding sel. (c) Gelembung melekat dan menyebabkan aliran deras senyawa (microjets). (d) Senyawa dalam bahan keluar menuju pelarut.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Metode UAE memiliki keuntungan yaitu mudah untuk ditangani, aman dan ekonomis (Vieira *et al*., 2013). Selain itu, Keuntungan dari UAE yaitu mengurangi waktu ekstraksi, energi dan penggunaan pelarut. Energi ultrasonik dapat memberikan beberapa manfaat lainnya yaitu pencampuran yang lebih efektif, transfer energi yang lebih cepat, pengurangan gradien termal dan temperatur ekstraksi, ekstraksi selektif, pengurangan ukuran peralatan, respon lebih cepat terhadap pengendalian proses ekstraksi, peningkatan produksi dan menghilangkan langkah-langkah proses seperti metode lainnya (Chemat *et al*., 2008). Namun, penggunaan metode ini juga memiliki kerugian yaitu penggunaan yang sulit dilakukan untuk skala besar, memiliki biaya pengerjaan tinggi serta gelombang yang ditimbulkan meskipun jarang terjadi dapat merubah struktur senyawa aktif dalam simplisia (Banu dan Catherine, 2015). Proses metode ini dapat diamati pada gambar 2.3 :



Gambar 2.3 Proses terjadinya ekstraksi menggunakan metode UAE

2.2.2 Ekstraksi Cair-Cair

Proses pemisahan selanjutnya masih menggunakan prinsip ekstraksi yang dikenal dengan ekstraksi cair-cair atau yang biasa dikenal dengan nama fraksinasi.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik (Dey, 2012).

Teknik pemisahan ekstraksi cair-cair ini biasanya dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Kedua pelarut yang saling tidak bercampur tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian digojok dan didiamkan. Solut atau senyawa organik akan terdistribusi ke dalam fasenya masing-masing bergantung pada kelarutannya terhadap fase tersebut dan kemudian akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas dan lapisan bawah yang dapat dipisahkan dengan membuka kunci pipa corong pisah (Odugbemi, 2008).

Ekstrak dipartisi dengan menggunakan peningkatan polaritas pelarut seperti petroleum eter, *n*-heksana, kloroform, dietil eter, etilasetat dan etanol. Pemilihan pelarut pada ekstraksi umumnya bergantung pada sifat analitnya dimana pelarut dan analit harus memiliki sifat yang sama, contohnya analit yang sifat lipofilitasnya tinggi akan terekstraksi pada pelarut yang relatif nonpolar seperti *n*-heksana sedangkan analit yang semipolar terlarut pada pelarut yang semipolar seperti etilasetat atau diklorometana (Venn, 2008).

2.3 Tinjauan Pelarut

Pelarut adalah zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan zat lain. Kesuksesan penentuan senyawa biologis aktif dari bahan tumbuhan sangat tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi. Sifat pelarut yang baik untuk ekstraksi yaitu toksisitas dari pelarut yang rendah, mudah menguap pada suhu yang rendah, dapat mengekstraksi komponen senyawa dengan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

cepat, dapat mengawetkan dan tidak menyebabkan ekstrak terdisosiasi (Tiwari *et al*., 2011). Pemilihan pelarut juga akan tergantung pada senyawa yang ditargetkan. Faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan pelarut adalah jumlah senyawa yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, keragaman senyawa yang akan diekstraksi, kemudahan dalam penanganan ekstrak untuk perlakuan berikutnya, toksisitas pelarut dalam proses *bioassay*, potensial bahaya kesehatan dari pelarut (Tiwari *et al*., 2011).

Senyawa *n*-Heksana adalah senyawa organik yang terbuat dari karbon dan hidrogen yang paling sering diisolasi sebagai produk sampingan dari minyak bumi dan penyempurnaan minyak mentah. Senyawa *n*-Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14}. Senyawa *n*-Heksana merupakan cairan tidak berwarna dan tidak berbau. Senyawa *N*-Heksana stabil pada suhu kamar, dan paling sering terjadi sebagai cairan berwarna, memiliki titik leleh sekitar -139,54°F (-95,3°C), titik didih 154,04°F (67,8°C), dan itu massa molar adalah 86,18 gram per mol (g/mol). *N*-Heksana juga merupakan molekul non-polar, yang berarti bahwa tidak larut dalam air dengan indeks polaritas sebesar 0,1 (Hani'ah, 2010).

2.4 Metabolite Profiling

Pemrofilan metabolit (*metabolite profiling)* merupakan metode analisis senyawa yang merupakan salah satu cabang dalam pendekatan metabolo ssdfvbnm,../mik yang bertujuan untuk memprofilkan macam-macam senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan. Metabolomik merupakan salah satu cabang penelitian "omik" yang fokus pada karakterisasi molekul metabolit dalam matriks

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

biologis secara keseluruhan, melalui identifikasi profil metabolit total dalam suatu organisme. Selain itu, metabolomik juga dapat diaplikasikan di bidang kesehatan, diagnostik, industri pangan, maupun mikrobiologi (Krastanov, 2010).

Metabolom mendiskripsikan tentang jumlah total metabolit, yaitu molekul kecil dari seluruh metabolit non peptida dalam sel atau organisme yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Molekul kecil ini merupakan metabolit sekunder yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan berperan dalam kelangsungan hidup serta adaptasi terhdap perubahan lingkungan (Nurmaida, 2016). Eksistensi metabolit dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan tempat tumbuh, penambahan bahan pendukung pertumbuhan, waktu panen, penangan pasca panen (Harwan *et al.*, 2015).

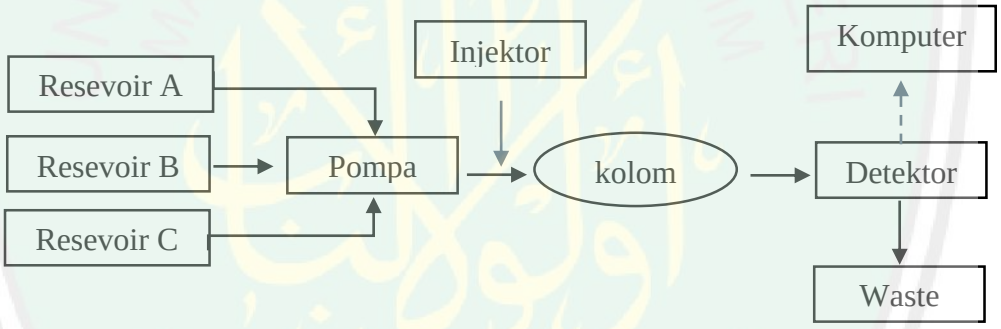
Pemrofilan metabolit mencakup tiga bagian, yakni penyiapan sampel, akuisi data analisis dan pengolahan data. Teknik analisis yang dapat digunakan untuk analisis metabolit, yaitu NMR, LC-MS, GC-MS, UPLC-MS, dan CE-MS. Tandem beberapa instrumen ditujukan untuk memudahkan dalam proses pengidentifikasian senyawa kimia dalam suatu tanaman, yang merupakan sistem kompleks dari puluhan hingga ratusan metabolit (Nurmaida, 2016).

2.5 UPLC-QToF-MS/MS

Ultra Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time of Flight – Mass Spectrometry (UPLC-QToF/MS/MS) merupakan teknik analisis kimia yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dalam kromatografi cair dengan kemampuan analisis massa dalam spektrometri massa. UPLC-QToF/MS/MS merupakan teknik ampuh yang digunakan untuk banyak aplikasi yang memiliki

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sensitivitas dan selektivitas sangat tinggi karena memiliki banyak keunggulan antara lain resolusi yang tinggi sehingga meningkatkan efisiensi pemisahan senyawa, partikel kolom yang kecil (sub-2µm) sehingga meningkatkan sensitivitas, *flow rate yang lebih tinggi* sehingga mengurangi waktu analisis yang dibutuhkan, tekanan yang lebih tinggi sehingga mampu memisahkan senyawa yang lebih kecil, mengurangi jumlah sampel yang dibutuhkan (Naushad and Khan, 2014), pengukuran massa monoisotop yang lebih akurat, spektra resolusi tinggi untuk konfirmasi target dan senyawa yang tidak diketahui serta memperoleh hasil yang lebih cepat tanpa menurunkan resolusi massa (Zhang *et al.*, 2015).



Gambar 2.4 Skema pengoperasian UPLC

Bagian-bagian komponen dalam instrumenasi UPLC terdiri dari: (Naushad dan Khan, 2014)

1. *Reservoir*: *Reservoir* digunakan sebagai wadah untuk menampung fase gerak/ eluen yang digunakan.
2. Pompa: Pompa berfungsi untuk memompa fase gerak pada kecepatan konstan dan menekan ke dalam kolom. Tekanan dan laju alir yang stabil dapat dicapai karena terdapat dua piston yang bekerja dalam fase berlawanan, ketika satu piston menekan eluen ke dalam kolom, piston lainnya menyedot eluen dari

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

reservoir. Tekanan yang dicapai berkisar antara 8000-15000 psi (600-1000 bar).

3. Injektor: Injektor berfungsi untuk menyuntikkan sampel uji ke dalam fase gerak diantara pompa dan kolom. Volume sampel yang diinjeksikan berkisar antara 2µl - 10µl. Pada *injector* terdapat *Autosampler* sehingga sampel dapat terinjeksikan dengan pengukuran secara otomatis.
4. Kolom: Kolom diibaratkan seperti "jantung dari kromatografi". Pada kolom terdapat fase diam yang berfungsi memisahkan komponen senyawa dari sampel dengan berbagai parameter fisik dan kimia. Partikel kecil kolom yang kurang dari 2 µm (1,7-1,8 µm) menyebabkan kolom dapat diberikan tekanan yang tinggi dengan *flow rates* yang normal.
5. Detektor: Detektor berfungsi untuk mengidentifikasi senyawa tunggal yang keluar dari dalam kolom dan mengukur jumlah dari senyawa tersebut sehingga peneliti dapat menganalisis komponen sampel secara kuantitatif. Detektor ini bisa berupa meteran fluoresensi, penyerapan UV, elektrokimia dan spektrometri massa.
6. Komputer: Komputer berfungsi untuk mengoperasikan seluruh sistem dalam instrumenasi serta untuk merekam sinyal dari detektor yang digunakan untuk menentukan waktu retensi, analisis kualitatif, dan analisis kuantitatif.

Analisis UPLC merupakan salah satu teknik kromatografi cair yang digunakan untuk segregasi dari komponen yang berbeda pada suatu campuran (misal, ekstrak dari bagian tumbuhan), dengan tingkat molekuler mencapai 2 mikron partikel analit. Analisis terhadap partikel kecil mensyaratkan tekanan kerja

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

pada instrumen yang besar (biasanya 6000 psi), hal tersebut dapat dipenuhi oleh UPLC tetapi tidak dengan instrumen HPLC. Metode ini mereduksi konsumsi fase gerak sampai dengan 80% yang dibandingkan dengan HPLC dengan *runtime* yang lebih singkat, sekitar 1,5 menit (Chawla dan Ranjan, 2016).

Tabel 2.1 Perbandingan antara HPLC dengan UPLC (Chawla dan Ranjan, 2016)

Karakteristik	**HPLC**	**UPLC**
Ukuran partikel	3-5 µm	Kurang dari 2 µm
Maximum backpressure	300-400 bars	1000 bars
Kolom analitik	C18	UPLC BEH C18
Ukuran kolom	150 x 3,2 mm	50 x 2,1 mm
Volume injeksi	5 µL	2 µL
Suhu kolom	30 C	65 C
Total *run time*	10 menit	1,5 menit
USP *resolution*	3,2	3,4
Plate count	2000	7500
Laju alir	3,0 ml/menit	0,6 ml/menit

UPLC memiliki prinsip kerja yang sama dengan HPLC, yakni berlandaskan teori van Deemter yang menjelaskan antara laju alir (*flow rate*) dan tinggi pelat (*plate height*).

$$H = A + \frac{B}{\upsilon} + C\upsilon$$

H menunjukkan tinggi ekuivalensi terhadap *theoretical plate* (HETP). HETP harus diperkecil guna meningkatkan efisiensi kolom. A, B & C merupakan konstanta, dan v merupakan *flow rate* (kecepatan linier) dari gas pembawa. Nilai A melambangkan faktor difusi pusaran yang nilainya tidak bergantung pada *flow rate*. Nilai B melambangkan tendensi dari difusi partikel. Efek nilai B akan semakin kecil pada *flow rate* yang tinggi, oleh karena itu pada rumus persamaan dibagi dengan v. Nilai C melambangkan resistensi kinetik untuk kesetimbangan selama proses

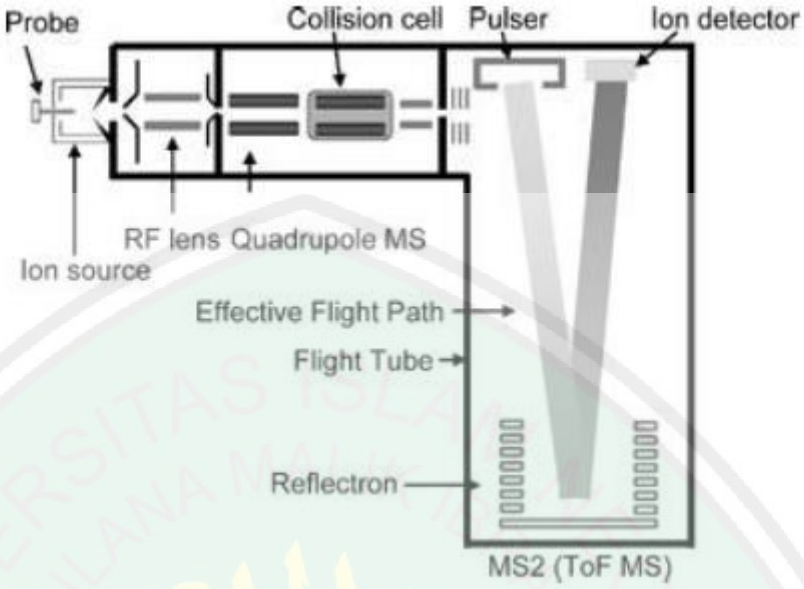
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

pemisahan. Resistensi kinetik merupakan *time lag* yang terlibat pada saat fase gerak melewati fase gerak (Gritter *et al.*, 1991; Chawla dan Ranjan, 2016).

Sistem eluasi dalam UPLC dapat secara isokratik, gradien linier, dan gradien non linier. Pada penelitian ini digunakan eluen berupa campuran 99,9% H2O + 0,1% asam format, dan 99,9% asetonitril + 0,1% asam format dengan sistem gradien non linier, karena dengan eluen tersebut mampu memisahkan metabolit secara optimal (Balcke *et al*., 2012).

Spektrometri Massa (MS) merupakan suatu teknik analisis instrumenal yang dapat dipakai untuk identifikasi serta penentuan struktur dari komponen analit dengan cara membuat suatu molekul netral menjadi bermuatan, lalu memisahkan ion tersebut berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan (*m/z*) sehingga dapat terdeteksi secara kualitatif dan kuantitatif dengan kelimpahan dan *m/z* masing-masing. Spektra (*mass spectrum*) merupakan hasil representatif dua dimensi dari intensitas sinyal terhadap perbandingan massa terhadap muatan (*m/z*). Intensitas dari suatu puncak sebagai sinyal biasanya melambangkan kelimpahan molekul ionik dari *m/z* masing-masing molekul yang sebelumnya berasal dari analit yang telah melewati sumber ion. *Tandem Mass Spectrometry* juga dikenal sebagai MS/MS atau MS2 merupakan teknik spektrometri massa yang melibatkan dua langkah seleksi massa dimana terdapat bentuk fragmentasi yang terjadi diantara spektrometri massa tahap 1 (MS1) dan spektrometri massa tahap 2 (MS2) (Gross, 2004).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.5 Bagan Instrumen Q-ToF-MS/MS

Sebuah spektrometri pada dasarnya terdiri dari 3 bagian utama yaitu sumber ion, analisator massa, dan detektor yang dioperasikan dalam tekanan tinggi. Ada berbagai macam teknik pengionisasi, penggunaannya tergantung pada fase dari sampel (padat, cair, gas) dan efisiensi berbagai mekanisme ionisasi untuk senyawa yang tidak diketahui. Sumber ion adalah bagian dari spektrometri massa yang mengionisasi analit yang akan dianalisis, ion-ion tersebut kemudian diangkut oleh medan magnet atau listrik menuju analisator massa. Teknik untuk ionisasi menjadi kunci untuk menentukan jenis sampel apa yang dapat dianalisis dengan spektrometri massa. Ionisasi elektron dan ionisasi kimia digunakan untuk gas dan uap. Dua teknik yang sering digunakan dalam sampel biologis cair dan padat meliputi *electrospray ionization* (ESI) dan *matriks assisted laser desorption ionization* (MALDI). ESI merupakan teknik ionisasi lunak yang menyelesaikan transfer ion dari fase cair menjadi fase gas. Teknik ini sangat berguna untuk analisis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

massa yang berukuran besar, senyawa yang kurang volatil, molekul yang dapat diberi muatan seperti protein dan asam polimer nukleat (Gross, 2004). Muatan energi yang tinggi pada permukaan tetesan ditentukan oleh muatan yang diatur pada e*lectric field*, sehingga terdapat ESI (+) [M+H]+ dan ESI (-) [M-H]- (Venn, 2008).

Analisator massa berfungsi untuk menganalisis massa dengan cara memisahkan ion sesuai dengan rasio perbandingan massa terhadap muatan (*m/z*) masing-masing. Terdapat berbagai macam jenis analisator massa yaitu, *time of flight*, *magnetic sector*, *linear quadrupole*, *three dimensional quadrupole ion traps*, dan *fourier transform cyclotron resonance*. Spektrometri massa tandem menggunakan perpaduan 2 analisator massa, sebagai contoh yaitu Q-TOF yang merupakan perpaduan antara *Quadrupole* dengan *Time of Flight*. Seleksi massa ion dalam *quadrupole* menggunakan pengaruh arus listrik searah (dc) dan frekuensi radio (rf). Akibat pengaruh dc dan rf, ion-ion di dalam *quadrupole* akan menempuh jalur yang berbentuk gelombang *massive* yang kemudian akan ditangkap oleh detektor. Sedangkan seleksi massa ion dalam *time of flight* menggunakan perbedaan kecepatan ion yang terdispersi dalam waktu selama perjalanan pada *flight path* (Gross, 2004). Keunggulan Q-TOF adalah menghasilkan pola isotop yang konsisten jarak kelimpahan yang luas mulai dari molekul kecil hingga molekul besar sehingga dapat memberikan pengukuran massa monoisotop yang akurat, serta dapat memberikan akuisisi spektra yang cepat dengan transmisi tinggi tanpa menurunkan kualitas resolusi massa yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk konfirmasi senyawa target dan identifikasi senyawa yang belum diketahui (Zhang, 2015).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.6 Metode *In silico*

In Silico merupakan sebuah metode dengan bantuan perangkat komputer yang dikembangkan dan diterapkan secara luas dan salah satunya untuk membantu pengembangan dalam bidang farmakologi. Metode *In silico* diantaranya mencakup penggunaan database, identifikasi kekerabatan, pengolahan data, pemodelan dan juga penambatan molekuler (*molecular docking*) (Ekins *et al*., 2007).

Molecular docking (penambatan molekul) dapat dianggap sebagai masalah gembok dan kunci (*lock and key*), protein dapat dianggap sebagai gembok dan ligan dapat dianggap sebagai kunci. *Molecular docking* (penambatan molekul) dapat didefinisikan sebagai masalah optimasi yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu (Mukesh dan Kumar, 2011). Ligan adalah molekul kecil yang berinteraksi dengan daerah ikatan (*binding site*) pada protein. Beberapa kemungkinan konformasi dalam ikatan antara ligan dan protein mungkin terjadi, yang disebut mode ikatan (Onkara *et al*., 2013).

Dalam desain obat modern, *molecular docking* secara rutin digunakan untuk memahami interaksi obat dengan reseptor dan seringkali digunakan untuk memprediksi orientasi ikatan dari kandidat obat pada protein target. Interaksi yang terjadi pada molekul obat dan protein target akan menghasilkan energi ikatan (*binding affinity*) dan aktivitas dari molekul obat tersebut (Onkara *et al*., 2013). Energi ikatan hasil doking merupakan parameter utama untuk mengetahui kesetabilan antara ligan dan protein. Interaksi antara ligan dan reseptor akan cenderung berada pada kondisi energi yang paling rendah. Energi yang paling rendah menunujukkan bahwa molekul berada pada kondisi yang stabil, sehingga

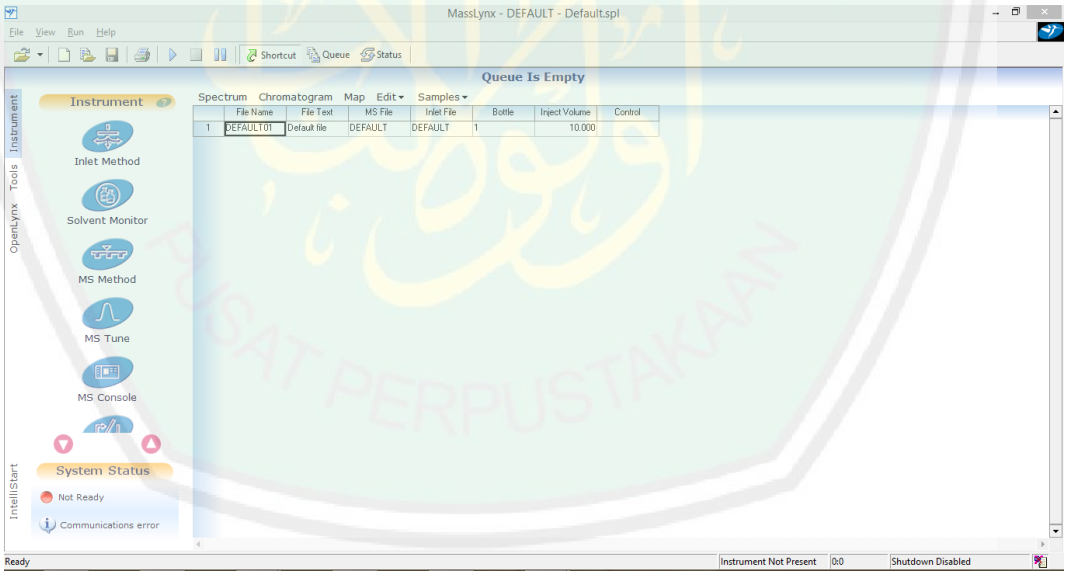
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

semakin rendah nilai binding afiniti maka interaksi ligan reseptor semakin stabil (Arwansyah *et al*., 2014). Interaksi ligan reseptor terdapat dua jenis ikatan yaitu agonis dan antagonis. Ikatan agonis adalah efek respon biologis yang diberikan oleh senyawa yang merangsang aktivitas, sedangkan ikatan antagonis adalah efek respon biologis yang diberikan oleh senyawa yang menurunkan aktivitas (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

2.7 *Software* Penunjang

2.7.1 MassLynx

MassLynk adalah software yang digunakan untuk menginterprestasi hasil data luas puncak, waktu retensi, *measured mass*, *calculated mass* dan rumus formula dari tiap-tiap puncak yang terdeteksi (Yang *et al*., 2017).

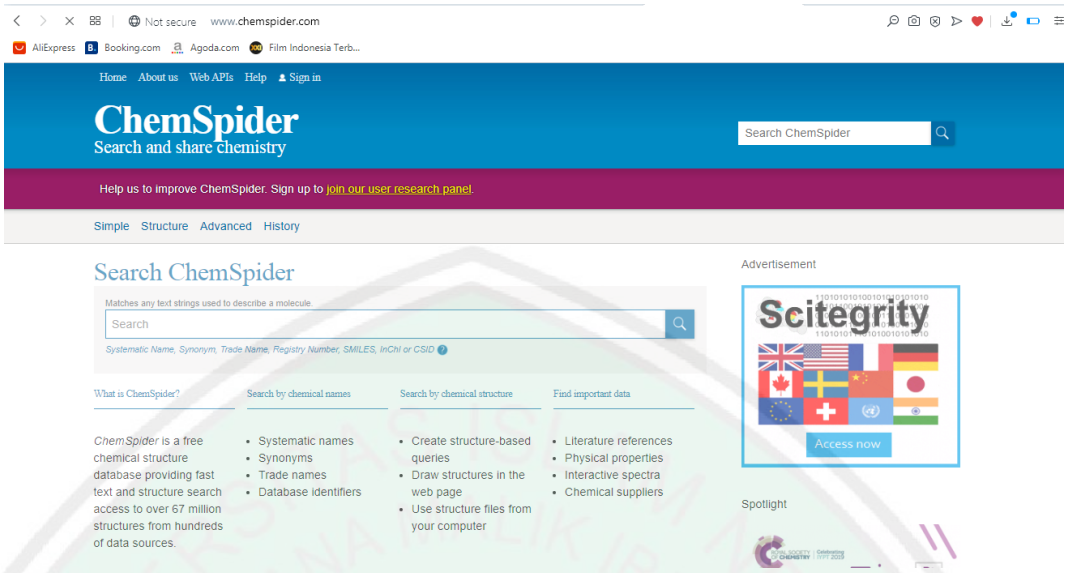


Gambar 2.6 Tampilan Software MassLynk

2.7.2 ChemSpider

ChemSpider adalah basis data kimia online gratis akses ke untuk hamper 25 juta senyawa kimia bersumber data terhubung hampir 400 sumber data terpisah di internet (Pence dan William, 2010).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

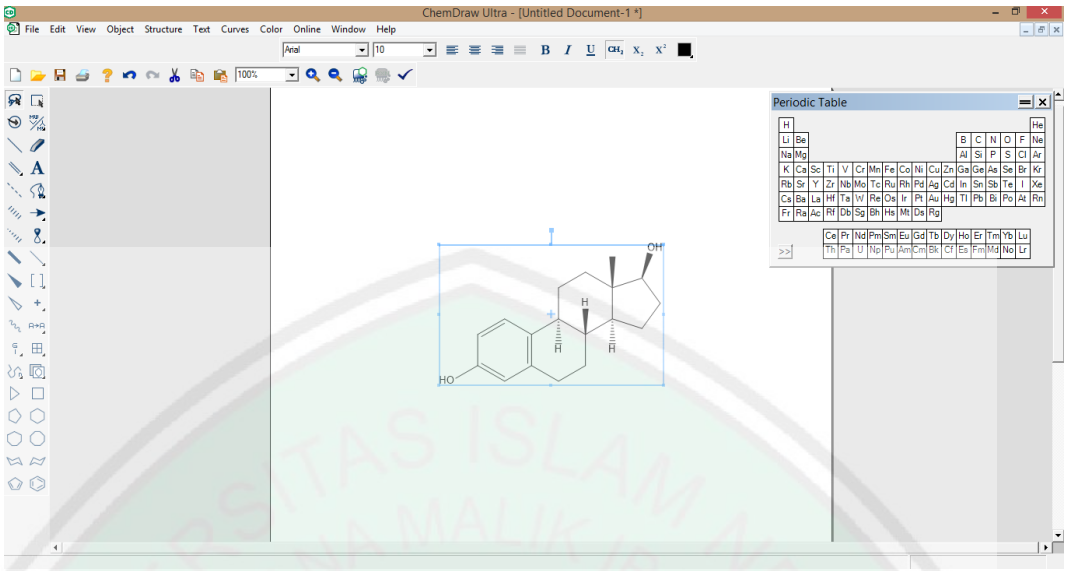


Gambar 2.7 Tampilan website ChemSpider

2.7.3 Chem Draw

Chem Draw merupakan software kimia dari produk CambridgeSoft.com. Chem Draw memiliki banyak fungsi, diantaranya membuat nama dan struktur senyawa, membuat struktur streokimia dengan benar dari nama kimia, menghitung rumus molekul dan berat molekul, dan mendapatkan nama IUPAC dengan akurat dari struktur. Perkiraan spektra NMR dari struktur suatu senyawa dengan atom langsung dengan korelasi spektral. Selain itu, Chem Draw dilengkapi dengan peringatan jika terjadi kesalahan dalam pembuatan struktur kimia. Peringatan tersebut biasanya berwarna merah dan mengelilingi bagian struktur yang salah (Agustina, 2018).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

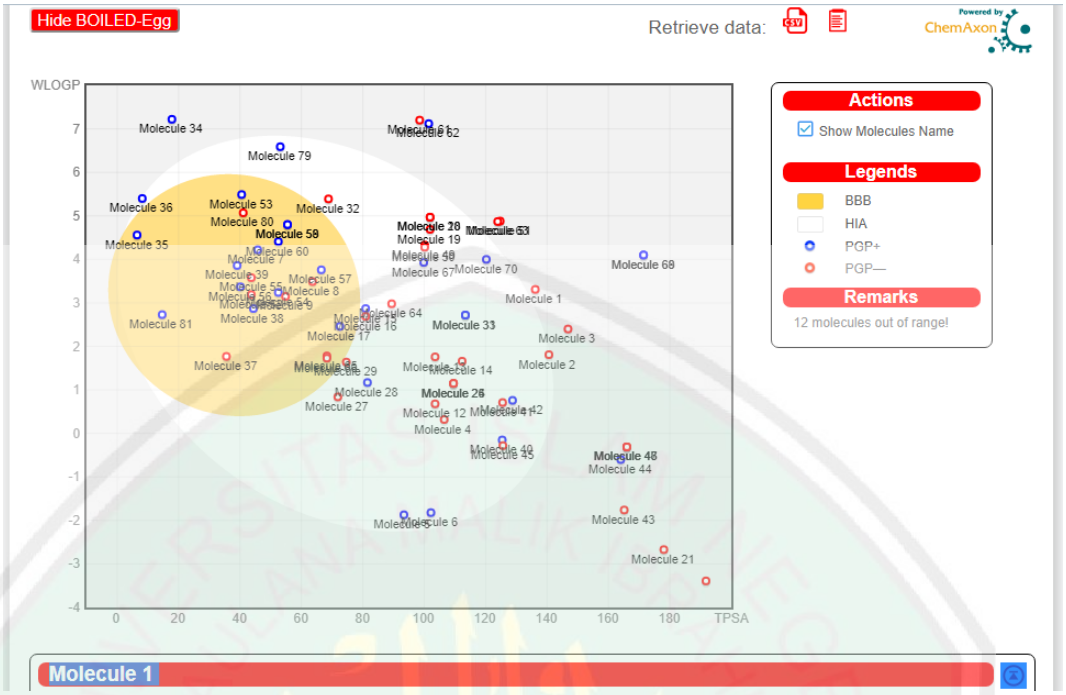


Gambar 2.8 Tampilan Software Chem Draw

2.7.4 SwissADME

SwissADME merupakan salah satu *software* online yang dapa diakses secara gratis dan dikenal sebagai *physichochemical descriptor* yang sering digunakan untuk meramalkan aktivitas dari suatu senyawa berdasarkan strukturnya. Keunggulan ini dimanfaatkan oleh berbagai kalangan terutama dalam upaya pengembangan obat baru dengan membantu memprediksi tidak hanya aktivitasnya berdasarkan sifat fisikokimia bahkan dapat memprediksi sifat dari senyawa tersebut ditinjau dari aspek farmakokinetik maupu farmakodinamikannya. Keunggulan lain dari SwissADME adalah cara mempresentasikan hasil prediksi dari banyak senyawa tersebut sehingga lebih mudah dalam tahapan analisisnya dengan menampilkan mode Boiled EGG dimana tampilan tersebut dapat menggambarkan secara visual sederhana prediksi kemampuan senyawa dalam terabsorbsi hingga dapat menembus BBB (Daina *et al*., 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

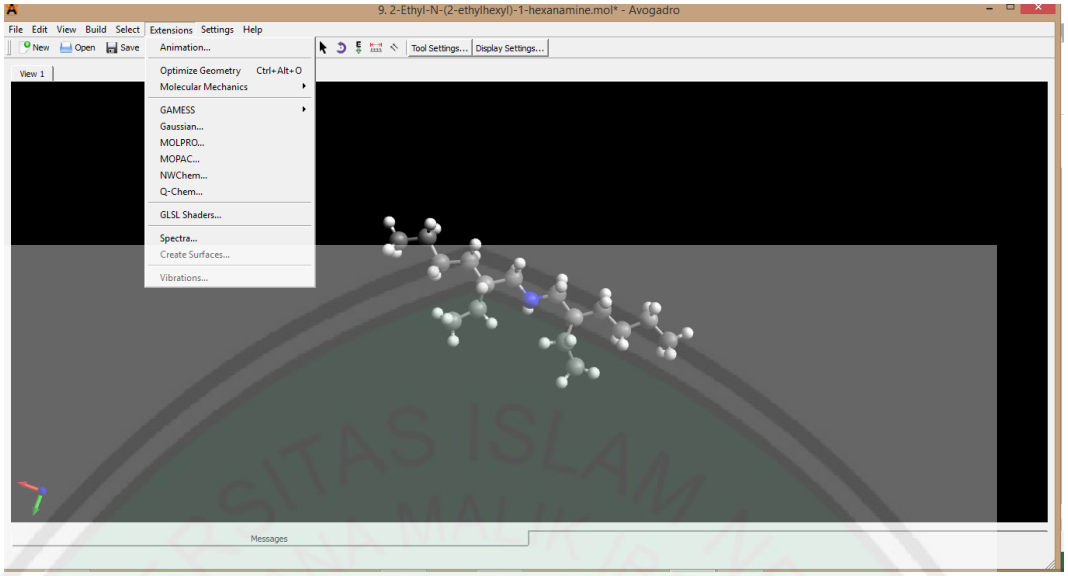


Gambar 2.9 Tampilan website swissADME

2.7.5 Avogadro

Avogadro mulai dikembangkan mulai tahun 2007 sebagai aplikasi untuk membuat kerangka kerja yang kuat dan fleksibel untuk membangun dan memvisualisasikan struktur molekul. Keunggulan lain yang ditawarkan aplikasi ini adalah selain membentuk struktur kimia secara 3 dimensi, juga dapat dipilih bentukan paling stabil dari struktur tersebut sehingga dapat semakin mempermudah mendapatkan data yang valid ketika senyawa uji ditambahkan pada reseptor target. Salah satu pemanfaatan aplikasi adalah membantu *software* Autodock untuk menemukan struktur geometri paling stabil dari struktur kimia sebelum dilakukan penambahan senyawa terhadap targetnya (Hanwell *et al*., 2012).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

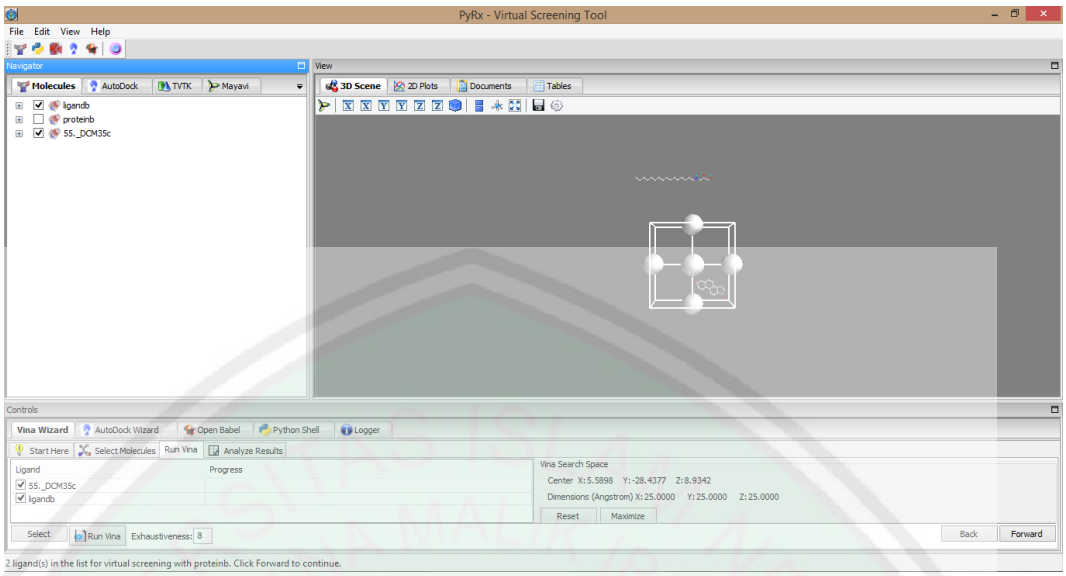


Gambar 2.10 Tampilan Avogadro saat optimasi struktur senyawa

2.7.6 AutoDock Vina

AutoDock Vina merupakan salah satu perangkat lunak yang didapatkan digunakan untuk penambatan molekul dan skrining virtual. Vina memiliki fungsi yang beragam, tingkat kinerja tinggi dan meningkatkan akurasi untuk mempermudah penggunaan (Sandeep *et al.*, 2011). Aplikasi ini dapat memproses penambatanl ebih dari satu molekul sekaligus serta meminimalkan ukurannya agar proses *docking* tidak terlalu lama. Penambatan melalui aplikasi ini akan mendapatkan *score docking* dari hasil interaksi suatu molekul ligan dengan reseptor (Troott dan Olson, 2009).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

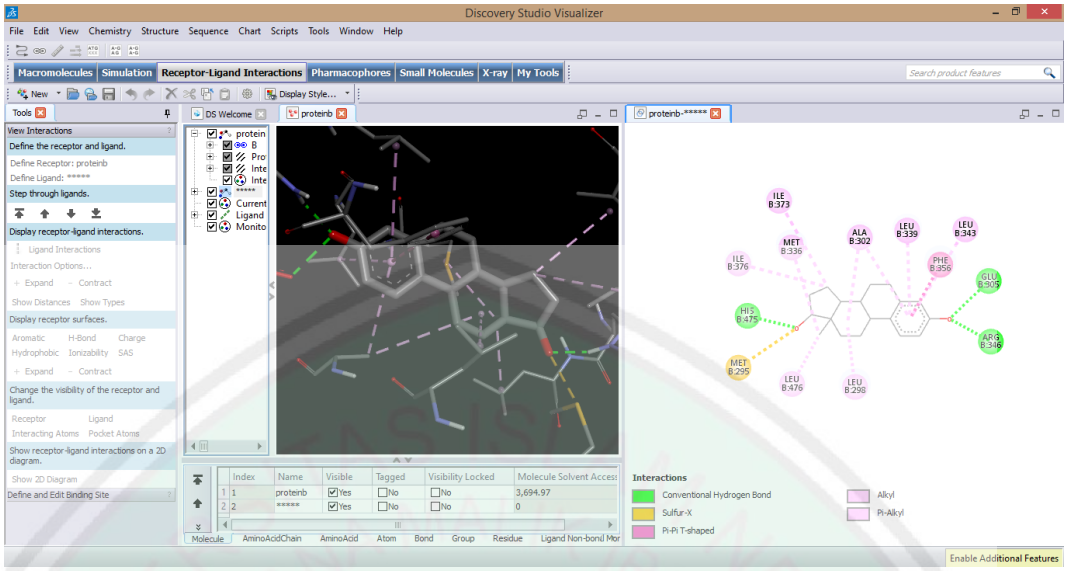


Gambar 2.11 Tampilan Autodockvina saat proses autogrid

2.7.7 Discovery Studio Visualizer

Discovery Studio Visualizer merupakan perangkat lunak yang dapat digunakan untuk visualisasi struktur molekul agar dapat dilihat gambaran yang interaktif dari struktur tersebut. Perangkat ini menampilkan gambar yang berkualitas tinggi dari hasil visualisasi struktur senyawa. Aplikasi ini dapat digunakan pada Windows dan Linux dan terintegrasi dengan desktop yang menyediakan akses ke fitur sistem operasi standar seperti sistem berkas, *clipboard*, dan percetakan (Accelrys Enterprise Platform, 2005).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.12 Tampilan Discovery Studio Visualizer saat analisis senyawa

2.8 Tinjauan Neurodegeneratif

Neurodegeneratif secara istilah didefinisikan sebagai gangguan dengan hilangnya neuron yang selektif dan keterlibatan yang berbeda dari sistem fungsional (Kovacs, 2010). Neuroinflamasi merupakan respon inflamasi (peradangan) di otak atau sumsum tulang belakang yang dimediasi oleh produksi sitokin (IL-1β, IL-6, dan TNFα), kemokin (CCL2, CCL5, CXCL1), *reactive oxygen species* (ROS), dan *secondary messenger* (NO dan prostaglandin). Kebanyakan mediator dibentuk oleh sel glial di susunan syaraf pusat (mikroglial dan astrosit), sel endotel, sel imun di perifer. Selain muncul karena virus, sumber neuroinflamasi lainnya adalah dementia vaskular dan depresi. Inflamasi memicu aktivasi sel imun, edema, kerusakan jaringan, dan berpotensi pada kematian sel (Disabato *et al*., 2016).

Secara spesifik, neuroinflamasi pada sistem syaraf dapat muncul karena kenaikan mikroglia teraktivasi (Matt and Johnson, 2015). Secara genetik, kenaikan mikroglia teraktivasi ini sendiri dapat muncul karena terjadinya defisiensi estrogen

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

pada wanita yang telah memasuki masa pasca menopause (Lee *et al*., 2013). Saat mengalami defisiensi estrogen, maka *estrogen receptor* (ER) tidak dapat menangkap estrogen yang diproduksi oleh tubuh sehingga terjadi penurunan jumlah ER teraktivasi salah satunya pada sistem syaraf pusat. Akibatnya terjadi peningkatan aktivitas *nuclear factor kappa-beta* (Nf-kβ) yang mempengaruhi sintesis protein sehingga menyebabkan neuroinflamasi (Villa *et al.*, 2016).

2.9 Tinjauan Neuroprotektif

Neuroprotektif adalah suatu mekanisme yang digunakan untuk melindungi atau mengurangi kerusakan syaraf pada sisitem syaraf pusat (SSP) yang disebabkan oleh serangan stroke iskemik, trauma atau karena penyakit neurogeneratif. Tujuan neuroprotektif adalah membatasi daerah yang terluka atau rusak (Katzung, 2002).

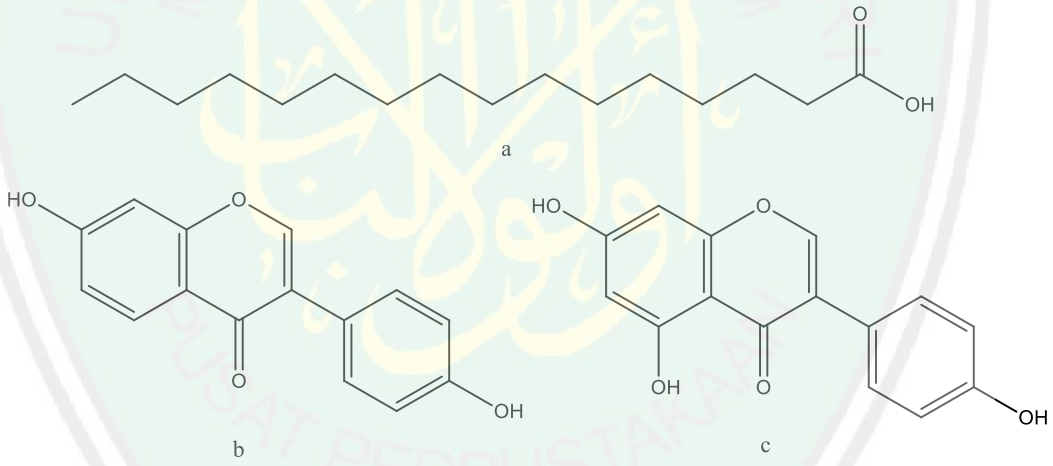
2.10 Tinjauan Fitoestrogen

Penggunaan bahan alami yang mengandung hormon atau fitohormon sudah banyak dikembangkan saat ini, salah satunya adalah fitoestrogen (Glover dan Assinder, 2006). Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki sifat dan khasiat yang sama dengan hormon estrogen atau dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen (Biben, 2012). Fitoestrogen sendiri dapat ditemukan dalam tanaman seperti semanggi, kedelai maupun kacang-kacangan lainnya (Michel *et al*., 2013).

Senyawa yang diketahui bertindak sebagai fitoestrogen pada semanggi adalah asam palmitat yang terkandung sebanyak 33,3% dalam semanggi (Ma'arif, 2018). Pada tumbuhan lain yang diketahui bertindak sebagai fitoestrogen adalah daidzein dan genestein. Daidzein dihasilkan oleh enzim hidrolitik bakteri lumen usus, dibentuk dari formononetin dan dimetabolisme menjadi equoal dan O-

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

desmetilangolesin (O-DMA). Sedangkan genistein dimetabolisme menjadi p-etil fenol estrogen inaktif dan dibentuk dari biochanin A. Proses metabolisme lignan tumbuh-tumbuhan seperti matairesinol dan sekoisolarisiresinol menghasilkan estradiol dan enterolakton. Proses pembentukan enterodiol terjadi dengan cara dehidroksilasi dan demetilasi sekoisolarisiresinol oleh mikroflora usus, sedangkan proses pembentukan enterolakton terjadi dengan oksidasi sekoisolarisiresinol oleh mikroflora lumen usus. Lignan banyak ditemukan pada beberapa bahan seperti kecambah (kadar tertinggi), biji bunga matahari, kacang-kacangan, dan semanggi. Selain itu, ditemukan beberapa senyawa lain yang mempunyai efek seperti estrogen yaitu flavon, chalcons, diterpenoid, triterpenoid, dan isoflavon (Ososki, 2003).



Gambar 2.13 Struktur (a) Asam palmitat (b) Daidzein dan (c) Genestein

2.11 Tinjauan Esterogen Reseptor Beta (ERβ)

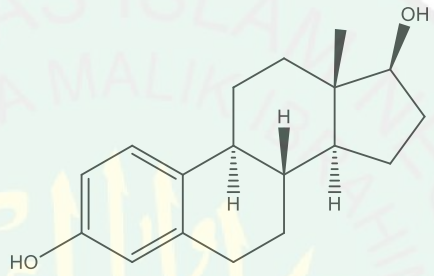
Salah satu jenis estrogen yaitu estradiol dapat mengatur fungsi mikroglia dan astrosit yang berhubungan dengan peradangan dengan menghambat pelepasan sitokin dan aktivasi serta migrasi sel imun (Asl *et al*., 2013). *Estrogen Receptor* pada tubuh manusia memiliki bentukan bergantung dari tempat ditemukannya

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

seperti pada membran sel akan ditemukan reseptor GPR-30 dan reseptor X sedangkan pada nukleus sel akan ditemukan reseptor α dan reseptor β (Villa *et al*., 2016). Reseptor yang cukup berperan dalam regulasi aktivitas neuron adalah ERα dan ERβ karena ekspresi dari keduanya dapat menjadi parameter awal terjadinya suatu patogenesis seperti Demensia maupun *Traumatic Brain Injury* (TBI) yang dapat diamati melalui penilaian *Mini Mental State Exam* (MMSE). Apabila ditinjau lebih lanjut, ERβ pada aktivitas neuron lebih difokuskan untuk diamati karena ERβ memiliki jumlah lebih banyak, lebih sensitif dalam berikatan dengan estrogen dan akan mengalami penurunan seiring dengan terjadinya penambahan usia (Rettberg *et al*., 2013; Villa *et al*., 2016). 17β-estradiol merupakan estrogen yang paling penting serta bentuk estrogen yang paling kuat. 17β-estradiol diproduksi oleh ovarium dan kelenjar adrenal, dan beredar di seluruh tubuh. 17β-estradiol telah terbukti dapat bertindak sebagai neuroprotektif (Rettberg *et al*., 2013). Mekanisme regulasi estrogen khususnya 17β-estradiol di otak adalah jalur ER-dependent, nuclear-initiated estrogen signaling estrogen akan berikatan dengan Esrogen receptor (ER). Estrogen yang berikatan dengan ER akan menjadi estrogen yang teraktivasi. ER teraktivasi akan bertranslokasi dari membran plasma ke nukleus di mana estrogen ER teraktivasi tersebut dapat merekrut faktor transkripsi dan kofaktor lain untuk urutan target spesifik DNA, estrogen response elements (EREs), dalam promotor gen yang responsif estrogen. Dalam jalur ini, terdapat dua mekanisme ikatan antara estrogen dengan ER, yaitu melalui jalur classical dan nonclassical. Pada jalur classical, ER yang teraktivasi dan masuk ke nukleus akan berikatan dengan EREs yang merupakan bagian dari DNA dan mengekspresikan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

protein-protein tertentu. Sedangkan pada jalur nonclassical ER teraktivasi tidak berikatan dengan EREs, namun berikatan dengan faktor-faktor transkripsi dan mempengaruhi aktivitasnya seperti faktor transkripsi stimulating protein-1 (SP-1), activator protein 1 (AP-1), *nuclear factor* κB (NF-κB), and c-jun. Selanjutnya berikatan dengan promotor DNA dan terjadi proses transkripsi menghasilkan protein (Cui *et al*., 2013).



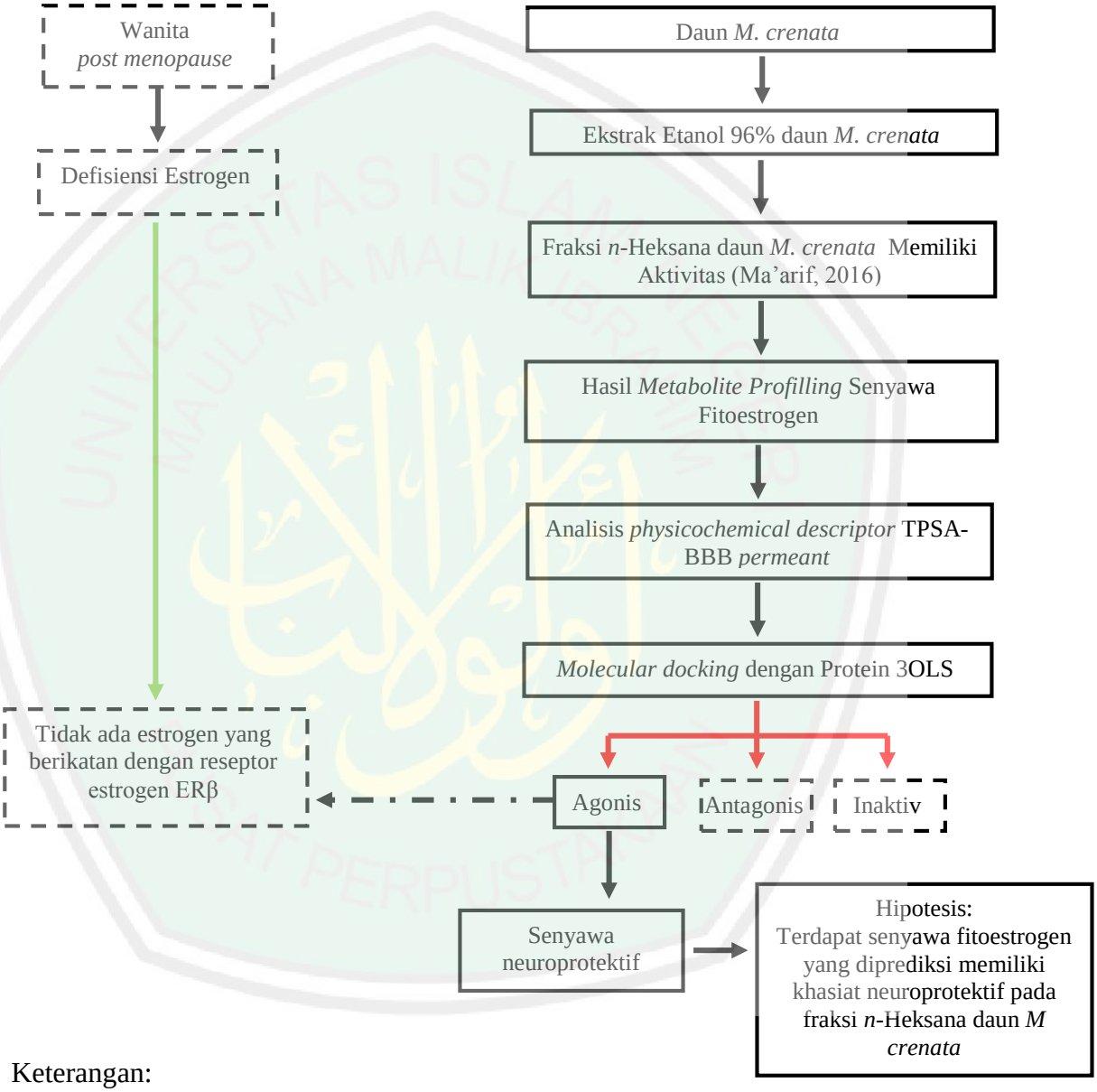
Gambar 2.14 Struktur 17β-estradiol

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

: Fokus Penelitian

: Pendukung Penelitian

: Alur Berpikir

: Hasil Proses

: Menghambat

: Masuk dan Berikatan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Postmenopause terjadi pada seorang wanita yang beratambah usia yang menyebabkan defisien hormon estrogen, sehingga menimbulkan terjadinya kerusakan sel syaraf pusat. Untuk mencegah kerusakan sel syaraf pusat digunakan fitoestrogen yang bersifat neuroprotektif. Salah satu tumbuhan yang diidentifikasi memiliki kandungan fitoestrogen adalah *M. crenata*. Kandungan fitoestrogen *M. crenata* berdasarkan penelitian sebelumnya ditemukan pada fraksi *n*-Heksana, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui metabolite sekunder dari fraksi *n*-Heksana *M. crenata* menggunakan instrumen UPLC-QToP-MS/MS. Instrumen ini memiliki kelebihan meningkatkan efisiensi pemisahan senyawa, mempercepat waktu analisis, mampu memisahkan senyawa yang lebih kecil, dan sampel yang dibutuhkan sedikit. Dilakukan *Physicochemical descriptor* untuk mengetahui senyawa yang dapat menembus membran sawar otak. Selanjutnya dilakukan uji *in silico* untuk mengetahui aktivitas senyawa yang terkandung pada fraksi *n*-Heksana *M. crenata*. Reseptor yang digunakan adalah 3OLS karena merupakan resptor dari 17β-estradiol. Apabila terbukti dalam *M. crenata* terdapat senyawa fitoestrogen yang diprediksi memiliki aktivitas neuroprotektif maka dapat dikembangkan menjadi obat neuropretektif defisiensi hormon estrogen pada wanita *postmenopause*.

3.3 Hipotesis

Terdapat senyawa fitoestrogen yang diprediksi memiliki khasiat neuroprotektif pada fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata*.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksperimental, yakni dengan mengidentifikasi profil metabolit dari fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* menggunakan UPLC-QToF-MS/MS dan studi *in silico* kandungan senyawa fitoestrogen dari fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* yang berikatan agonis dengan protein 3OLS.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Desember 2019 hingga Februari 2020. Studi *in silico* dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Departemen Biologi Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Preparasi sampel dan identifikasi sampel dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Bareskrim Polri, Jakarta Timur, Indonesia.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Tanaman menggunakan Daun *M. crenata* yang diambil dari Benowo Surabaya, Jawa Timur.
2. Reseptor ERβ menggunakan protein *X-ray* dengan ID 3OLS dari www.rcsb.org.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* untuk *metabolite profiling*.
2. Senyawa hasil *metabolite profiling* Fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* yang memenuhi kriteria TPSA dan BBB *permeant* untuk *in silico.*

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah

1. Hasil *metabolite profiling* dari fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata.*
2. Interaksi senyawa fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* dengan protein 3OLS yang diprediksi memiliki aktivitas neuroprotektif dan *binding affinity* terendah pada studi *in silico*.

4.4.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol 96% merupakan Ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi daun *M. crenata* dengan pelarut etanol 96%.
2. Fraksi *n*-Heksana merupakan fraksi yang didapatkan dari proses ekstraksi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dengan pelarut *n*-Heksana.
3. Hasil *metabolite profiling* fraksi *n*-Heksana *M. crenata* merupakan senyawa-senyawa dalam *M. crenata* yang diperoleh dari hasil interpretasi data spektra menggunakan UPLC-QToF-MS/MS.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4. *Topological Polar Surface Area* (TPSA) merupakan besaran nilai yang menjelaskan kemampuan yang dimiliki suatu senyawa untuk dapat menembus membran (Kelder *et al*., 1999; Martin, 2005).
5. *BBB Permeant* merupakan kemampuan senyawa menembus membran sawar otak berdasarkan sifat fisikokimia yang dimiliki senyawa tersebut.
6. *Binding Affinity* merupakan kemampuan senyawa untuk dapat berikatan dengan protein target dengan memberikan energi bebas paling stabil.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat penelitian terdiri dari, seperangkat instrumen UPLC-QToF-MS/MS (*Waters*) dan computer Komputer Lenovo Intel(R) Core(TM) i3-4030U CPU @1.90Hz.

Tabel 4.1 Spesifikasi Instrumen UPLC-QToF-MS/MS

Instrumen UPLC	
Alat	ACQUITY UPLC®H-Class System (*Waters*)
Kolom	ACQUITY UPLC®HSS C18 (1.8 µm 2.1x150 mm) (*Waters*)
Eluen	99,9% Asetonitril + 0,1% Asam Format (A) dan 99,9% Air + 0,1% Asam Format (B)
Flow Rate	0,2 ml/menit selama 23 menit
Volume Injeksi	5 µl (disaring melalui 0.2 µm *syring filter* dahulu)
Metode Eluasi	Sistem Gradien
Instrumen MS	
Alat	Xevo G2-S QToF (*Waters*)
Sumber Ion	ESI Positif (+)
Analisator Massa	*Quadrupole* dan *Time-of-Flight*
Collision Energy	4 Volt dan 25-70 volt
Mass Analysis Range	30-1200 m/z
Source Temperature	100°C
Desolvation Temperature	350°C
Desolvation Gas Flow	793 *L/hr*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian terdiri dari simplisia serbuk daun *M. crenata* segar yang berasal dari Benowo Surabaya, Jawa Timur, aquadest, anisaldehid asam sulfat, etanol 96% (*Merck*), *n*-Heksana (*Merck*), diklorometan (*Merck*), asetonitril (*Merck*), asam format (*Merck*).

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 *Metabolite Profiling*

Preparasi sampel dilakukan terlebih dahulu sebelum diinjeksikan kedalam instrumen UPLC-MS. Metode yang digunakan dalam preparasi sampel ini yaitu *Solid Phase Extraction* (SPE). Fraksi kering sebanyak 10 mg dilarutkan dengan 10 mL pelarut lalu dimasukkan ke dalam kolom SPE yang telah dikondisikan. Bahan organik yang tertinggal di kolom tersebut dielusi dengan 10 mL metanol. Filtrat metanol ditampung lalu dilanjutkan dengan dielusi menggunakan 10 mL diklorometan, filtrat diklorometan kemudian ditampung hingga terdapat filtrat metanol dan filtrat diklorometan pada wadah yang terpisah.

Metabolite profiling fraksi *n*-Heksana dilakukan dengan menggunakan instrumen UPLC-MS. (1) Sampel yang telah dipreparasi lalu diinjeksikan kedalam instrumen UPLC-MS sebanyak 5µL menggunakan *micro syringe*. (2) Setelah itu diperoleh data mentah berupa kromatogram dan spektra sampel yang selanjutnya diolah dengan software *Masslynx* untuk didapatkan data luas puncak, waktu retensi, *measured mass*, *calculated mass* dan rumus formula dari tiap-tiap puncak yang terdeteksi. (3)Selanjutnya dilakukan interpretasi data melalui website *Chemspider* dan software *Chemdraw* untuk diperoleh nama dan struktur kimia dari

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

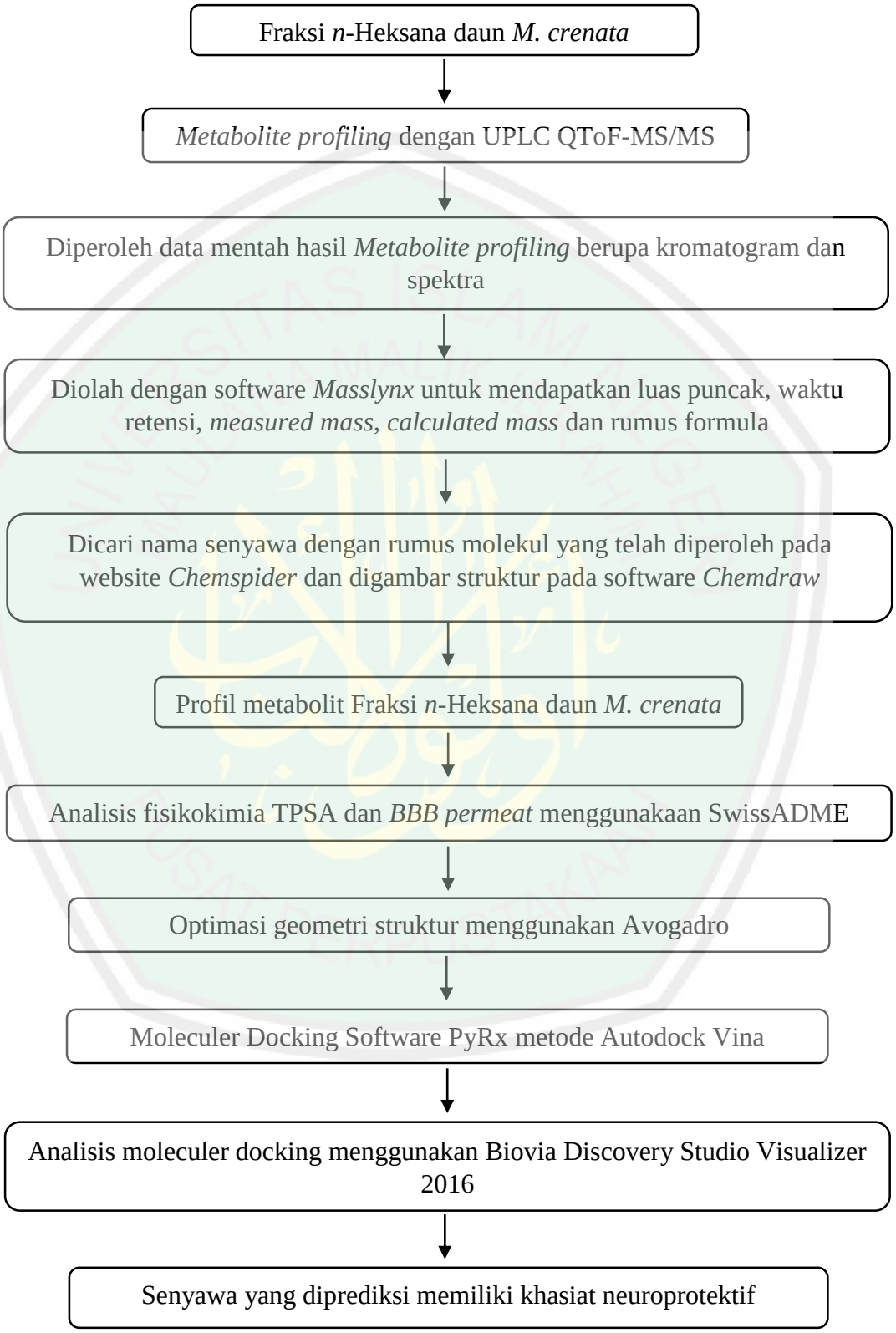
senyawa yang telah ditemukan, sehingga diperoleh profil metabolit dari fraksi *n*-Heksana Daun *M. crenata*.

4.6.2 Uji *In silico*

Persiapan dalam uji *in silico* adalah (1) mengunduh protein *X Ray* dengan ligand 17 β estradiol diuduh dari *Protein Data Bank*. (2) Dilakukan preparasi untuk memisahkan liqan dengan proteinnya menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer 2016 (Muchtaridi *et al*., 2018). (3) Setalah dipisahkan antara ligan dan protein dilakukan validasi internal antara ligan 17 β estradiol dengan protein 3OLS untuk menentukan metode tepat dalam melakukan penambahan senyawa inklusi hasil metabolit profiling fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata*. (4) Pada senyawa hasil *metabolite profiling* pada fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* dilakukan preparasi awal untuk mencari senyawa yang menjadi kandidat senyawa yang berkhasiat obat dengan ketentuan nilai TPSA <79 (Kelder *et al*., 1999) dan *BBB Permeant* Yes menggunakaan SwissADME (Daina *et al*., 2007). (5) Senyawa hasil *metabolite profiling* fraksi *n*-Heksana daun *M. crenata* yang masuk dalam kriteria dilakukan optimasi geometri struktur menggunakan Avogadro untuk mencari energi minimal dengan metode MMFF94. (6) Dilakukan *molecular docking* senyawa yang masuk kriteria dengan PyRx metode Autodock Vina. (7) Hasilnya kemudian dianalisis menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer 2016 untuk mengetahui gugus farmakofor yang berperan dalam senyawa.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.7 Skema penelitian



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR PUSTAKA

Accelrys Enterprise Platform. 2005. *Introduction to the Discovery Studio Visualizer*. San Diego, California, U. S. A: Accelys Software Inc.

Afriastini, J.J. 2003. *Marsilea crenata* Presl. in Cryptograms : ferns and fern allies.

Agarwal, S., Alzahrani, F. A., Ahmed, A. 2018. Hormone Replacement Therapy: Would it be Possible to Replicate a Functional Ovary. *International Journal of Molecular Sciences.*

Agustina, W., Susanti, E., Yunita, P. N., Yamtinah, S. 2018. *Modul Chemoffice.* Surakarta: Program Studi Pendidikan Kimia Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Alldredge,B.K., Corelli, R.L., Ernst, M.E., Guglielmo, B.J., Jacobson, P.A., Kradjan, W.A., Williams, B.R. 2013. *Applied Therapeutics*. PA: Lippincot Williams Dan Wilkins.

Arwansyah, A., Ambarsari, L., Sumaryada, T. I. 2014. Simulasi *Docking* Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat. *Current. Biochem.* 1 (1): 11-19.

Asl, S. Z., Khaksari, M., Khachki, A. S., Shahrokhi, N., Nourizade, S. 2013. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury. *J. Neurosung*. 119:353-361.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norularni. N. A. N., Omar, A. K. M. 2013. Technique for Extraction of Bioactive Compound from Plant Material. *J. Food Engineering*. 117: 426-436.

Balcke, G. U., Handrick, V., Bergau, N., Fichtner, M., Henning, A., Stellmach, H., Tissier, A., Hause, B., Frolov, A. 2012. An UPLC-MS/MS Method for Highly Sensitive High-Throughput Analysis of Phytohormones in Plant Tissues. *Plant Methods.* Volume 8: 1-11

Banu, K. S dan Chathrine, L. 2015. General Tecniques Involed in Phytochemical Analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*. Vol 2 (5).

Biben, H.A. 2012. Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan keamanan penggunaannya. *Estrogen sebagai sumber hormon alami.* Seminar ilmiah

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Chemat, F., Tomao, V dan Virot, M. 2008. In Otles, S. (Ed), *Handbook of Food Analysis Instrumens. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis*. CRC Press, pp. 85-94.

Chawla, G. and Ranjan, C. 2016. Principle, Instrumenation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography: *Open Chemistry Journal*. Volume 3: 1-16

Cui, J., Shen, Y, Li, R. 2013. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways durin Aggeing: From Periphery to Brain. *Trends Mol Med*. 19(3).

Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. 2017 SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness and Medicinal Chemistry Friedliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. Vol 7 (42717).

Dey, P. M. 2012. *Methods in Plant Biochemistry.* Vol I. USA: Academic Press. Halaman 81-82.

Disabato, D. J., Quan, N., Godbout, J. P. 2016 Neuroinflamtion: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*. Vol 139 (2)

Ekins, S., Mestres, J., Testa, B. 2007. *In silico* Pharmacology for Drug Discovery: Applications to Targets and Beyond. *British Journal Pharmacology.* 152, 21-37.

Esclapez M. D., García-Pérez J. V., Mulet A, Cárcel J. A.2011. Ultrasoundassisted extraction of natural products. *Food Eng Rev*. Vol 3 (2)

Glover A. and Assinder S.J. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormon receptor expression. *Jour. Endoc*. 189: 565-573

Gritter, R. J., Bobbit, J. M., and Schwarting, A. E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terjemahan oleh Kosasih P. Bandung: ITB Press

Gross, J. H. 2004. *Mass Spectrometry*. Berlin: Springer

Hani'ah, M. 2010. *Intisari dan Kumpulan Rumus Kimia*. Yogyakarta: Tunas Publishing.

Hanwel, M, D., Donald E Curtis, D. E., David C Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Eva Zurek, E and Hutchison, G. R. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. Vol 4 (7).

Harwan, D., Suhendi, A., Trisharyati, I., Santoso, B., Safitri, M., Haryoto. 2015.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Analisis Profil Metabolit Sekunder Ekstrak Lempuyang Emprit dengan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa. *University Research Colloquium*: 158-166.

Herlina, W. 2011. *Kitab Tanaman Obat Nusantara disertai Indeks Pengobatan*. Yogyakarta: MedPress

Katzung, B.G., 2002, *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

Kelder, J., Grootenhuis, P. D. J., Bayada, D. M., Delbressine, L. P. C., Ploemen, J. P. 1999. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. *Pharmaceutical Research*. Vol 16 (10).

[KEMENAG RI] Kementerian Agama Republik Indonesia. 2015. *Al-Qur'an dan Tafsirnya* (edisi yang disempurnakan). Jakarta: Widya Cahaya

Kitchen, Douglas., B, Helene Decornez, Jhon R. Furr dan Jurgen Bajorath. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and application. *Nature Reviews. Drug Discovery*. Vol 3.

Kovacs, G. Botond, H. Budka. 2010. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *Acta Neuropathol*; 119: 389–408.

Krastanov, A. 2010. Metabolomics – The State of Art. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Volume 24: 1537-1543.

Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su,W-H., Chen, C-P., Wang, P-H. 2013. Hormone theraphy for postmenopausal women And unanswered issue. Elsevier: *Gynecology and Minimally Invasive Theraphy*. Vol 2.

Ma'arif, B., Mirza, D., M., Suryadinata, A., Muchlisin, M., A., Agil, M. 2019. Metabolite Profiling of 96% Ethanol Extract from Marsilea crenata Presl. Leaves Using UPLC-QToF-MS/MS and Anti-Neuroinflammatory Predicition Activity with Molecular Docking. *Journal of Trophical Pharmacy and Chemistry*. Vol 4 (6).

Ma'arif, B., Agil, M., Laswati, H. 2016. Phytochemical Assessment on *N*-Hexane Extract and Fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Throught GC-MS .*Traditional Medicine Journal* 21 (2).

Ma'arif, B, ZA. 2012. Isolasi Senyawa Golongan Terpenoid Dari Ekstrak *n*-Heksana Daun *Marsilea crenata Presl*. (isolasi ekstrak *n*-Heksana dengan Rf 0,33 pada fase gerak *n*-Heksana :etil asetat (4:11). *Skripsi*. Surabaya:

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Departemen Farmakognosi Dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga; Hal 4-6.

Matt, S. M., dan Johnson, R. M. 2015. Neuro-Immune Dysfunction During Brain Aging: New Insights in Microglial Cell Regulation. *Current Opinion In Pharmacology*. 26 : 96-101.

Medina-Torres, N., Ayora-Talvare, T., Espinosa-Andrews, H., Sanchez-Conteras, A., Pacheco, A. 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* Vol 7 (47).

Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., 2013. New concepts, experimental approaches,and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Med*. 79, 514–532.

Mirza, D., M. 2019. Studi *In Silico* dan *In Vitro* Aktivitas Antineuroinflamsi Ekstrak Etanol 96% Daun *Marsilea crenata* C Presl. *Skripsi*. Malang: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Muchtaridi, M., Dermawan, D., Yusuf, M. 2018. Molecular Docking, 3D Structure-Based Pharmacophore Modeling, and ADME Prediction of Alpha Mangostin and Its Derivatives against Estrogen Receptor Alpha. *Journal of Young Pharmacists*, Vol 10 (3)

Mukesh, B. dan Kumar, R. 2011. Molecular Docking: a Review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2 (6): 1746-1751.

Mukhriani, 2014, Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif, *Jurnal Kesehatan*, 7(2): 361-367.

Naushad, M., Khan, M. R. 2015. *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Evaluation and Applications in Food Analysis*. New York: CRC Press.

Ngaha Njila, M. I., Mahdi, E., Lembe, M. E., Nde, Z., Nyonseu, D. 2017. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. *ACBES-2017*.

Nurmaida. 2016. *Pemrofilan Metabolit Tabat Barito (Ficus deltoidea) Menggunakan UPLC-QTOF-MS/MS [Tesis]*. Bogor: Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor (IPB).

Odugbemi, T. 2008. *A Textbook of Medicinal Plants from Nigeria*. Yoba-Lagos: University of Lagos Press.

Onkara, P., Kumar, A. S., Kanakaraju, B., Prasanna, B., Pydisetty, Y.,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Chandramouli, G. V. P. 2013. Molecular Docking Studies, Synthesis and Anti-Bacterial Properties of New Mannich Bases. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2): 263 – 270.

Ososki, A. L. and Kennelly, E. J. 2003. Phytoestrogens; a Review of the Present State of Research. *Phythotherapy research.*

Pence, H. E. and Williams, A. 2010. ChemSpider: An Online Chemical Information Resource. *American Chemical Society and Division of Chemical Education.* Vol 87 (11).

Rettberg, J. R., Yao, J., Brinton, R. D. 2013. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in Neuroendocrinology*.

Sandeep, G., Nagasree, K. P., Hanisha, M., & Kumar, K. 2011. Audocker LE: A GUI for Virtual Screnning with Autodock Vina. *BMC Research Notes.*

Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah, Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an.* Jakarta: Lentera Hati.

Siswandono dan Soekardjo, B., 2000, *Kimia Medisinal, Edisi 2*. Surabaya: Airlangga University Press.

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E. W. Jr. 2014. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol Rev*. 66:334–395

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G., Kaur H., 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Sciencia, 1 (1), 98-106*

Trisunuwati, P. 2017. Efficacy of Water Clover (Marsilea crenata) Extract Against Blood Estrogen-Pregesterone Balance, Blood Calcium Level and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (Rattus novergicus). *Research Journal of Life Science*. Vol. 1.

Troott, O dan Olson, A. J. 2009. Software News and Update Autodock Vina: Improving the Speed and Accurary of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimazation and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry.* Vol. 31 (2).

Venn, R. F. 2008. *Principles and Practice of Bioanalysis: Second Edition*. New York: CRC Press

Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A. A., Hubinger, M. D. 2013

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Chemical and Economic Evaluation of Natural Antioxidant Extracts Obtained by Ultrasound-assisted and Agitaed Bed Extraction from Jussara Pulp (*Euterpedulis*). *J. Food Eng*. Vol 119. Pp, 196-204.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry A review. *Innov Food Sci Emerg*. Vol 9(2).

Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A. 2016 Esterogens, Neuroinflammation and Neurogeneration. *Endocrine Society*.

Wadood, A., Ahmed, N., Shah, L., Ahmad, A., Hassan, H., Shams, S. 2013. In Silico Drug Design: An Approach Whish Revolutionarised the Drug Discovery Process. *OA Drug Design and Delivery*. 1 (1).

Wonorahardjo, S. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia.* Malang : Indeks.

Yacoeb, A. M., Nurjanah, Arifin, M., Sulistiono, W., Kristiono, S. S. 2010. Description and histological changes in the chemical composition of the leaves and stalks of *Marsilea crenata* Presl. by boiling. *Journal of Fishery Products Processing Indonesia* XII. 2: 81-95.

Yang, S., Shan, L., Luo, H., Sheng, X., Du, J., Li, Y. 2017. Rapid Classification and Identification of Chemical Components of Schisandra Chinensis by UPLC-Q-TOF/MS Combined with Data Post-Processing. *Molecules*. 22.

Zhang, Z., Bo, T., Bai, Y., Ye, M., An, R., Cheng, F., Liu, H. 2015. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for demystifying traditional Chinese medicine. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Volume 72: 169-180.e

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG