

**STUDI *IN SILICO* AKTIVITAS ANTI AGING EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) TERHADAP ESTROGEN
RECEPTOR ALPHA (2QA8)**

SKRIPSI

Oleh :

AKHMAD SYARIFUDIN

NIM. 15670026



PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2022

**STUDI *IN SILICO* AKTIVITAS ANTI AGING EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) TERHADAP ESTROGEN
RECEPTOR ALPHA (2QA8)**

SKRIPSI

Oleh :

AKHMAD SYARIFUDIN

NIM. 15670026

**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)**

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

2022

**STUDI *IN SILICO* AKTIVITAS ANTI AGING EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) TERHADAP ESTROGEN
RECEPTOR ALPHA (2QA8)**

SKRIPSI

Oleh:
AKHMAD SYARIFUDIN
NIM. 15670026

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 23 JUNI 2022

Pembimbing I



Dr. apt. Burhan Ma'arif Z. A, M.Farm.

NIP. 19900221 201801 1 001

Pembimbing II




**Fidia Rizkiah Inayatillah, S.ST.,
M.keb**

NIP. 19851209 200912 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi




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

**STUDI *IN SILICO* AKTIVITAS ANTI AGING EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C Presl.) TERHADAP ESTROGEN
RECEPTOR ALPHA (2QA8)**

SKRIPSI

**Oleh:
AKHMAD SYARIFUDIN
NIM. 15670026**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Farmasi (S. Farm)
Tanggal: 24 JUNI 2022**

Ketua Penguji : apt. Wirda Angraini, M.Farm


(.....)

NIP. 19930718 20180201 2 205

Anggota Penguji : 1. Dr. apt. Burhan Ma'arif Z.A., M. Farm


(.....)

NIP. 19900221 201801 1 001

2. Fidia Rizkiah Inayatillah, S.ST., M.keb


(.....)

NIP. 19851209 200912 2 004

3. apt. Abdul Hakim, M.P.I., M. Farm


(.....)

NIP. 19761214 200912 1 002

Mengesahkan,

Ketua Program Studi Farmasi



apt. Abdul Hakim, M.P.I., M.Farm

NIP. 19761214 200912 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : AKHMAD SYARIFUDIN

NIM : 15670026

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul : Studi In Silico Aktivitas Anti Aging Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi
(*Marsilea crenata* C Presl.) Terhadap Estrogen Receptor Alpha (2QA8)

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 30 Juni 2022

Yang membuat pernyataan,



Akhmad Syarifudin

NIM.15670026

MOTTO

إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ ۗ

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah suatu kaum, sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri”

(Ar Rad:11)

وَاسْتَعِينُوا بِالصَّبْرِ وَالصَّلَاةِ ۚ وَإِنَّهَا لَكَبِيرَةٌ إِلَّا عَلَى الْخَاشِعِينَ ۚ

“Dan mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan salat. Dan (salat) itu sungguh berat, kecuali bagi orang-orang yang khusyuk,”

(Al- Baqarah : 45)

وَمَنْ سَلَكَ طَرِيقًا يَلْتَمِسُ فِيهِ عِلْمًا سَهَّلَ اللَّهُ لَهُ بِهِ طَرِيقًا إِلَى الْجَنَّةِ

“Siapa yang menempuh jalan untuk mencari ilmu, maka Allah akan memudahkan baginya jalan menuju surga.” (HR. Muslim, no. 2699)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Allhamdulillahirobbil'alamin

Puji syukur kepada Allah SWT dan shalawat serta salam kepada Nabi Muhammad SAW sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Disertai rasa syukur yang mendalam, penulis persembahkan karya tulis sederhana ini kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mendukung penulis hingga saat ini.

Kepada kedua orang tua tercinta. Allah hadirkan bersama kedua orang tua yang selalu memberi dukungan yang tak terbendung, memberikan semangat yang tak tamat, dan tentunya selalu mengarahkan tanpa paksaan. Semoga Allah senantiasa memberikan rahmat, keberkahan, dan ketinggian derajat dunia akhirat.

Kepada saudara-saudaraku terkasih, hadirnya mereka yang kebersamai dengan dukungan Semoga Allah memberikan keberkahan dalam hidup mereka.

Kepada keluarga besar penulis yang telah memberikan dukungan yang tak terhingga dalam berbagai aspek. Semoga keberkahan selalu menyelimuti keluarga kami. Begitupun untuk guru-guru yang telah menyalurkan ilmunya kepada penulis dengan ikhlas. Semoga Allah memberikan keberkahan dalam hidup mereka.

Kepada keluarga *Phytoestrogen Project*. Dr. apt. Burhan Ma'arif Z. A, M.Farm. yang telah banyak memberikan bimbingan serta arahan dalam segala aspek, juga tak lupa menanamkan pelajaran kehidupan yang semoga tak luntur disapu waktu. Semoga Allah membalas beliau dengan keberkahan hidup dan sebaik-baik balasan.

Kepada segenap sivitas akademika Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, terutama Bapak dan Ibu dosen yang telah membagikan ilmu pengetahuannya

Tidak lupa team dari berbagai angkatan, kakak-kakak *Phytoestrogen* yang selalu hadir berbagi keilmuan, serta Reyhan partner seproyekan. Semoga Allah memudahkan langkah mereka dalam menggapai impian.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, segala puji dan rasa syukur selalu tertuju kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat, nikmat, serta hidayah-Nya, sehingga penulisan proposal skripsi yang berjudul “**Studi In Silico Aktivitas Anti Aging Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata C Presl.*) Terhadap Estrogen Receptor Alpha (2QA8)**” dapat terselesaikan dengan baik dan lancar. Shalawat serta salam tak lupa selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, yang telah membimbing umat Islam dari zaman jahiliyah menuju zaman yang terang benderang ini.

Penulis dengan rendah hati menyampaikan bahwa selesainya proposal skripsi ini juga atas bantuan dari berbagai pihak yang telah mendukung. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P.W, M.Kes,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, sekaligus selaku penguji utama untuk proposal skripsi ini.

4. Dr. apt. Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm. dan Ibu Fidia Rizkiah Inayatillah, S.ST., M.keb selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, nasehat, dan motivasi hingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. apt. Wirda Anggraini, M.Farm selaku penguji utama yang telah memberikan masukan dan wawasan dalam penulisan skripsi ini.
6. Segenap sivitas akademika Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, terutama Bapak dan Ibu dosen yang telah membagikan ilmu pengetahuannya.
7. Keluarga tercinta yang tak pernah berhenti melafalkan doa dan dukungan, baik secara moril maupun materiil.
8. Seluruh pihak yang tak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan naskah ini jauh dari kata sempurna. Maka dari itu, perlu adanya kritik dan saran khususnya dari para pembaca. Semoga proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi setiap pembaca, terlebih bagi penulis, Aamiin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 27 Juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
MOTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
مستخلص البحث	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan Masalah	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Penuaan kulit (skin aging) wanita menopause	7
2.2 Tinjauan Tentang Fitoestrogen	8
2.3 Tinjauan <i>M.crenata</i>	9
2.3.1 Klasifikasi Tanaman <i>M. crenata</i>	9
2.3.2 Habitus dan Morfologi Tanaman <i>M. crenata</i>	9
2.3.3 Kandungan <i>M. crenata</i>	10
2.3.4 Manfaat <i>M. crenata</i>	10
2.4 Tinjauan Estrogen	11
2.5 Tinjauan Metode <i>In silico</i>	10
2.6 Aplikasi Penunjang	16
2.6.1 SwissAdme	16
2.6.2 Avogadro 1.0.1	18
2.6.3 Autodock Vina	19
2.6.4 <i>Biovia Discovery Studio Visualizer</i> 2016	20
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1 Bagan Kerangka Konseptual	22
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	23
3.3 Hipotesis	23
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	24
4.2 Waktu dan Tempat	24
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	24
4.3.1 Variabel Bebas	24
4.3.2 Variabel Terikat	24

4.3.3 Variabel Kontrol	25
4.3.4 Definisi Operasional	25
4.4 Alat dan Bahan Penelitian	26
4.4.1 Alat	26
4.4.2 Bahan	26
4.5 Prosedur Penelitian.....	26
4.5.1 Prediksi Sifat Fisikokimia.....	26
4.5.2 Prediksi Toksisitas senyawa.....	27
4.5.3 Preparasi Sampel <i>In silico</i>	28
4.5.4 Penambatan Ligan dan Protein	28
4.7 Skema Alur Penelitian.....	29
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Preparasi Senyawa	30
5.2 Preparasi Sampel <i>In Silico</i>	32
5.3 Penambatan Ligan dan Protein.....	33
5.5 <i>Molecular Docking</i>	35
5.7 Potensi antiAging dari Ekstrak <i>Marsilea crenata</i>	39
5.1 Integrasi Penelitian dengan Kajian Al-Qur'an.....	41
BAB VI PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	44
6.2 Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN-LAMPIRAN	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Marsilea crenata</i> C. Presl.....	9
Gambar 2.2 Struktur estrone, Estradiol, Estriol dan Estetrol	11
Gambar 2.3 Mekanisme jalur pensinyalan estrogen.....	14
Gambar 2.4 Tampilan Software Chem Draw	16
Gambar 2.5 Tampilan website swissADME	17
Gambar 2.6 <i>Protocx Online Tools</i>	18
Gambar 2.7 Tampilan Avogadro saat optimasi struktur senyawa.....	19
Gambar 2.8 Tampilan Autodockvina saat proses autogrid.....	20
Gambar 2.9 Tampilan Discovery Studio Visualizer.....	20
Gambar 5.1 Hasil Pengunduhan 2QA8	33
Gambar 5.2 visualisasi <i>native ligand</i> pada 2QA8	35
Gambar 5.3 visualisasi <i>Kaempferol</i> pada 2QA8	37
Gambar 5.4 visualisasi <i>2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid</i> pada 2QA8.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 <i>Parameter Uji Fisikokimia</i>	27
Tabel 4.2 Parameter Uji Sitotoksik	27
Tabel 5.1 Senyawa yang tidak memenuhi standar Lipinski	31
Tabel 5.2 Validasi Internal Autodock Vina ID 2QA8.....	34
Tabel 5.3 Hasil <i>molecular docking</i>	36
Tabel 5.4 Fisikokimia senyawa dengan SwissADME	38

DAFTAR SINGKATAN

ADP	: Adenosine diphosphate
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ER α	: <i>Estrogen Receptor Beta</i>
HBA	: <i>Hydrogen Bond Aceptor</i>
HBD	: <i>Hydrogen Bond Donor</i>
IGF- 1	: <i>Insuline-like Growth Factor-1</i>
LD50	: <i>Lethal Dose 50</i>
MMP9	: <i>Matrix Metalloproteinase-9</i>
Nf-KB	: <i>Nuclear Faktor Kappa B</i>
PDB	: <i>Protein Data Bank</i>
RMSD	: <i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SIRT1	: <i>Sirtuin 1</i>
SMILES	: <i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i>
TPSA	: <i>Topological Polar Surface Area</i>
TSH	: <i>Terapi Sulih Hormon</i>
UPLC-QToF-MS/MS	: <i>Ultra Performance Liquid Chromatography Quadropole Time Of Flight - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry</i>

ABSTRAK

Syarifudin, Akhmad, 2022. **Studi *In Silico* Aktivitas Anti Aging Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C Presl.) Terhadap Estrogen Receptor Alpha (2QA8).** Skripsi. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. apt. Burhan Ma'arif Z. A, M.Farm.; Pembimbing II: Fidia Rizkiah Inayatillah, S.ST., M.keb

Ilmu pengetahuan telah menemukan cara untuk mencegah penuaan kulit pada wanita menopause. Salah satu terapinya adalah terapi sulih estrogen (17 β -estradiol). Penuaan kulit pada wanita menopause dikaitkan dengan penurunan ekspresi ER α . Fitoestrogen telah mendapatkan perhatian sebagai antiaging karena efek sampingnya yang lebih sedikit. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk memprediksi efek anti aging senyawa ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* melalui jalur aktivasi ER α (ID 2QA8). Senyawa hasil *metabolite profiling* UPLQ-QToF MS/MS ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* dilakukan analisis sifat fisikokimia menggunakan SwissADME dan toksisitas menggunakan ProTox II *online tool*. Analisis ini dilakukan sebagai seleksi awal keamanan senyawa untuk terapi. Hasil seleksi 31 senyawa dipreparasi menggunakan aplikasi ChemDraw 12.0. Optimasi geometri dilakukan dengan menggunakan aplikasi Avogadro 1.2.0, kemudian dilakukan *molecular docking* dengan aplikasi PyRx 0.8 dengan metode Autodock vina. Visualisasi hasil *docking* dilakukan menggunakan aplikasi Biovia Discovery Studio 2021 untuk mencari interaksi agonis terhadap ER α . Nilai RMSD $\leq 2\text{\AA}$ menandakan penambatan valid dan aplikasi dapat digunakan. Hasil studi *in silico* menunjukkan dari 43 senyawa hasil *metabolite profiling* terdapat 2 senyawa yang bersifat agonis terhadap ER α . Senyawa tersebut memiliki sifat fisikokimia sesuai standar *lipinski* sehingga dapat berikatan dengan ER α . Persen area 2 senyawa tersebut kecil sehingga tidak dapat dijadikan dasar utama efek anti penuaan dari *Marsilea crenata*.

Kata Kunci: *Marsilea crenata*, fitoestrogen, antiaging, *molecular docking*, 2QA8

ABSTRAK

Syarifudin, Akhmad, 2022. **In Silico Study Of Antiaging Activity Of 96% Ethanol Extract Of Clover (*Marsilea crenata* C Presl.) Against Estrogen Receptor Alpha (2qa8)**. Thesis. Pharmacy Study Program. Faculty of Medicine and Health Science. Maulana Malik Ibrahim Islamic State University Malang. Supervisor I: Dr. apt. Burhan Ma'arif Z. A, M.Farm.; Supervisor II: Fidia Rizkiah Inayatillah, S.ST., M.keb

Science has found a way to prevent skin aging in postmenopausal women. One of the therapies is estrogen replacement therapy (17 β -estradiol). Skin aging in postmenopausal women is associated with decreased ER α expression. Phytoestrogens have received attention as antiaging because of their fewer side effects. The purpose of this study was to predict the anti-aging effect of the 96% ethanol extract of *Marsilea crenata* through the ER α activation pathway (ID 2QA8). The metabolite profiling compound UPLQ-QToF MS/MS 96% ethanol extract of *Marsilea crenata* was analyzed for physicochemical properties using SwissADME and toxicity using ProTox II online tool. This analysis was carried out as an initial selection of the safety of compounds for therapy. The results of the selection of 31 compounds were prepared using the ChemDraw 12.0 application. Geometry optimization was carried out using the Avogadro 1.2.0 application, then molecular docking was carried out with the PyRx 0.8 application using the Autodock vina method. Visualization of docking results was carried out using the Biovia Discovery Studio 2021 application to look for agonist interactions with ER α . RMSD value 2Å indicates valid tethering and application can be used. The results of the in silico study showed that of the 43 compounds resulting from the metabolite profiling, there were 2 compounds that were agonists against ER α . These compounds have physicochemical properties according to Lipinski standards so that they can bind to ER α . The percentage area of these 2 compounds is small so they cannot be used as the main basis for the anti-aging effect of *Marsilea crenata*.

مستخلص البحث

أحمد شريف الدين، 2022. *الدراسة إين سيليكو لأنشطة مضاد للشيخوخة في الإيثانول 96%*
للبرسيم إلي مستقبلية ألفا إستروجين. البحث العلمي. قسم الصيدلة، كلية الطب
والعلم الصحية، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف
1: الدكتور صيدلاني برهان معارف، الماجستير. المشرفة 2: فيديا رزقية عناية
الله، الماجستير.

لقد وجد العلم طريقة لمضاد لشيخوخة الجلد عند النساء بعد انقطاع الطمث. منها العلاجات ببدائل
الإستروجين. تكون شيخوخة الجلد عند النساء بعد انقطاع الطمث بانخفاض تعبير $ER\alpha$. كان
فيتويستروغنز الاهتمام كمضاد للشيخوخة بسبب أقل آثارها الجانبية. كان الغرض من هذه الدراسة
هو التنبؤ بالتأثير المضاد للشيخوخة لمستخلص الإيثانول بنسبة 96%. من *Marsilea crenata* خلال
مسار تنشيط $ER\alpha$ (ID 2QA8). تم تحليل مركب التنميط المستقلب $UPLQ-QToFMS/MS$ 96% من
مستخلص الإيثانول من *Marsilea crenata* من أجل الخصائص الفيزيائية والكيميائية باستخدام
SwissADME والسمية باستخدام أداة *ProTox II* عبر الإنترنت. تم إجراء هذا التحليل كاختيار
الأول لسلامة المركبات للعلاج. تم تحضير نتائج اختيار 31 مركبًا باستخدام تطبيق *ChemDraw*
12.0. تم إجراء تحسين الهندسة باستخدام تطبيق *Avogadro 1.2.0*، ثم تم تنفيذ الإرساء الجزيئي
باستخدام تطبيق *PyRx 0.8* باستخدام طريقة *Autodock vina*. تم إجراء تصور لنتائج الإرساء
باستخدام تطبيق *Biovia Discovery Studio 2021* للبحث عن تفاعلات ناهضة مع $ER\alpha$.
تشير قيمة $RMSD 2\text{\AA}$ إلى ربط صالح ويمكن استخدام التطبيق. أظهرت نتائج دراسة السيليكو أنه
من بين 43 مركبًا ناتجًا عن التنميط المستقلب، كانا مركبان منبهتان مع $ER\alpha$. تتمتع هذه المركبة
بخصائص فيزيائية كيميائية وفقًا لمعايير ليبينسكي بحيث يمكنها الارتباط بـ $ER\alpha$. النسبة المئوية لهذين
المركبين صغيرة حتى لا يمكن استخدامها كأساس رئيسي للتأثير في مضاد للشيخوخة لـ *Marsilea*
crenata.

الكلمات المفتاحيات: *Marsilea crenata*، فيتويستروغنز، الاهتمام بزيادة الأعمال، مضاد
للشيخوخة، مكافحة الالتحام، 2QA8

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan suatu tahapan biologis yang terjadi sebagai bagian dari proses penuaan pada wanita dan berdampak pada terjadinya defisiensi estrogen (Lee *et al.*, 2013). Defisiensi estrogen merupakan penurunan aktivitas hormon estrogen yang memiliki daya ikat dengan reseptor estrogen (Cui *et al.*, 2013). Selama keadaan defisiensi estrogen berlangsung terjadi penurunan produksi dari hormon estrogen sehingga memberikan efek buruk pada tubuh wanita, karena hormon estrogen berperan dalam pembentukan sel dan menjaga sel dari kerusakan. Salahsatu bagian tubuh yang terpengaruh defisiensi estrogen adalah kulit, sehingga kulit mengalami penuaan (Villa *et al.*, 2016).

Defisiensi estrogen mempercepat kulit mengalami penuaan. Penuaan kulit dikaitkan dengan kualitas kolagen pada kulit yang menurun karena berkurangnya jumlah estrogen reseptor yang aktif sehingga kulit mengalami penurunan elastisitas, peningkatan kerutan, peningkatan kekeringan dan kulit menjadi semakin tipis (Thornton MJ. 2005). Penuaan kulit memengaruhi kehidupan sosial wanita yang didukung adanya fakta bahwa kulit merupakan bagian tubuh yang paling sering terpapar oleh factor-faktor luar dan juga merupakan hal yang pertama kali nampak dari seorang individu saat berinteraksi dengan orang lain, sehingga terjadinya penuaan kulit terutama pada wanita akan menurunkan kepercayaan diri serta mempengaruhi kualitas hidupnya (Xie C, Jin J, Lu X, Tao J, Wang R and Miao, 2015).

Terapi sulih hormon atau *hormone replacement therapy* (HRT) adalah jenis pengobatan yang paling banyak diresepkan bagi wanita mengatasi defisiensi estrogen di negara-negara maju (Rachman *et al.*, 2004). Terapi sulih hormon atau *hormone replacement therapy* (HRT) dapat mengurangi risiko terkena penyakit penuaan, sehingga dapat menjadi solusi anti penuaan kulit atau anti aging pada wanita yang mengalami defisiensi estrogen di usia lanjut (Stevenson *et al.*, 2007). Estrogen akan memberikan efeknya melalui reseptor estrogen pada kulit. Estrogen mengatur fisiologi kulit meningkatkan penyembuhan luka dan respons imun serta mempertahankan elastisitas dan fleksibilitas kulit (Thornton MJ., 2013). Dalam jangka panjang HRT dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya seperti *coronary event*, *venous thromboembolism*, *stroke*, kanker payudara, dan demensia (Lee *et al.*, 2013). Banyak studi mencari bahan yang mempunyai efek estrogenik sebagai alternatif dari HRT diantaranya fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan golongan senyawa yang berasal dari tumbuhan yang memiliki kemiripan fungsi, struktur atau dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan memiliki efek yang serupa. Senyawa golongan fitoestrogen juga dilaporkan mempunyai aktivitas dalam mengurangi keluhan penyakit yang muncul akibat defisiensi estrogen (Yang *et al.*, 2012). Fitoestrogen diklasifikasikan menjadi tiga kategori: isoflavon, coumestan, dan lignan, genistein adalah isoflavon yang paling penting. Kesamaan struktural dengan 17β -estradiol menjelaskan efek seperti estrogen (Sator, Schmidt, Rabe, & Zouboulis, 2004). Genistein telah diuji pada persiapan kosmetik anti aging dan telah menunjukkan hasil untuk elastisitas kulit dan pencegahan kanker kulit. Kosmetik krim yang mengandung genistein (aglikon) telah digunakan untuk meningkatkan kulit kering dan keriput, Uji klinis gel 4 % genistein yang diaplikasikan selama 24

minggu pada kulit wanita pasca-menopause mampu meningkatkan konsentrasi *hyaluronic acid* kulit (Polito et al., 2012).

أَوْ لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Tafsir kata *awalam yarouu ilaa* menunjukkan agar manusia 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 berarti 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. Ayat ini menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan beragam tumbuhan yang bermanfaat di muka bumi ini untuk diambil manfaat darinya (Shihab, 2002).

Tumbuhan semanggi (*Marsilea crenata*) adalah salah satu tanaman yang dapat dimaksimalkan potensinya. Kandungan fitoestrogen diketahui ada pada tumbuhan semanggi (*Marsilea crenata*) yang terkenal di Surabaya Jawa Timur sebagai makanan khas masyarakat setempat (Yacoeb et al., 2010; Laswati, 2011). Beberapa penelitian telah dilakukan terhadap *M. Crenata*. *M. crenata* memiliki senyawa golongan saponin, terpenoid, steroid, polifenol, serta senyawa antioksidan (Nurjanah et al., 2010; Yacoeb et al., 2010). Pengujian menggunakan

Radioimmunoassay (RIA) menunjukkan bahwa *estradiol-like compound* pada ekstrak etanol 96% terdeteksi cukup tinggi (Laswati, 2011). Hal yang sama ditemui pada pengujian *in vitro* menggunakan sel osteoblas MC3T3-E1 yang diberi ekstrak n-heksan *M. crenata* memberikan peningkatan proses proliferasi dan diferensiasi sel osteoblas tersebut (Ma'arif, 2018). Begitu pula pada penelitian *in vivo* menggunakan tulang femur mencit betina yang meningkat kepadatannya karena pemberian ekstrak n-heksan, ekstrak etanol 96%, dan fraksi etil asetat daun *M. crenata* (Adityara, 2017; Widiasari, 2017).

Ilmu pengetahuan dan teknologi komputasi yang semakin maju dan berkembang merupakan peluang untuk mengembangkan simulasi dan kalkulasi dalam merancang obat. Metode yang digunakan pada suatu kondisi ke dalam simulasi komputer dengan menggunakan program tertentu disebut metode *in silico* (Hardjono, 2016). Metode *in silico* dapat digunakan dalam memprediksi aktivitas suatu senyawa dengan *Molecular docking* (penambatan molekul), yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu (Mukesh dan Kumar, 2011) Serta meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi target aksinya pada uji secara *in vitro* (Kitchen, 2004).

Uji aktivitas anti aging ini ditunjukkan dengan mensimulasikan ikatan protein-ligan yang terjadi, serta afinitas dan interaksi dengan asam amino antara senyawa dengan reseptor. Data protein yang digunakan adalah 2QA8 yang merupakan salah satu bentuk protein reseptor $E\alpha$, sehingga 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. (Rettberg *et al.*, 2013).

Berdasarkan latar belakang perlu dilakukan penelitian mengenai uji *in silico* hasil *metabolite profiling* yang terfokus pada ikatan agonis. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui interaksi antara senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* hasil *metabolite profiling* dengan protein 2QA8 secara agonis, sehingga dapat memberikan data-data ilmiah yang dapat dijadikan acuan untuk penelitian lebih lanjut agar bermanfaat pada penggunaannya sebagai tumbuhan obat dan mendorong pemanfaatan tanaman *M. crenata* dengan lebih baik.

1.2 Rumusan masalah

1. Apakah terdapat senyawa fitoestrogen yang memiliki khasiat anti aging pada ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* C Presl.?
2. Bagaimana sifat fisikokimia senyawa ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* C Presl yang dapat berikatan dengan ER α pada sel kulit?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui potensi senyawa fitoestrogen yang memiliki aktifitas anti aging pada ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata*
2. Mengetahui sifat fisikokimia senyawa ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* yang mampu berikatan dengan ER α pada sel kulit.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini terbagi menjadi manfaat secara teoritis dan manfaat secara terapan, diantaranya sebagai berikut:

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas anti aging yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* C Presl. sebagai pengembangan obat tradisional.

1.4.2 Manfaat Terapan

Manfaat bagi mahasiswa Penelitian ini diharapkan dapat membawa wawasan dan pemahaman terkait daun *Marsilea crenata*, fitoestrogen, anti aging, dan in silico.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagian tanaman *Marsilea crenata* C Presl. yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun yang berwarna hijau muda yang diperoleh dari Benowo Surabaya Jawa Timur.
2. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak dari daun *Marsilea crenata* menggunakan pelarut etanol serta menggunakan metode ekstraksi ultrasonik.
3. Protein yang digunakan dalam simulasi berbasis komputer adalah protein *XRay* dengan id protein 2QA8 dari RCSB
4. Software yang digunakan adalah ChemDraw 15, Avogadro, Biovia Discovery Studio 2016 *Visualizer*, dan *Autodock vina*.
5. Software online yang digunakan adalah SwissAdme.
6. Interaksi antara ligan dan reseptor yang diamati adalah ikatan agonis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penuaan Kulit (Skin Aging) Wanita Menopause

Kulit adalah bagian tubuh manusia yang paling luar. Seperti organ lainnya, penuaan pada kulit mempengaruhi sifat struktural dan fungsionalnya, dan psikologi manusia. Setelah menopause banyak wanita mengalami penuaan kulit dengan cepat, berkurangnya tingkat estrogen (estradiol, estriol, dan estrone) di sirkulasi darah ditemukan menjadi salah satu faktor utama yang mempengaruhi penuaan kulit (Politoet al., 2012; Pontius dan Smith, 2011).

Pada kulit normal, estrogen memberikan efeknya melalui reseptor estrogen pada kulit. Estrogen mengatur fisiologi kulit dengan bekerja pada keratinosit, fibroblas, melanosit, folikel rambut dan kelenjar sebaceous. Estrogen juga meningkatkan angiogenesis, penyembuhan luka dan respons imun serta mempertahankan elastisitas dan fleksibilitas kulit. Estrogen terlibat dalam regulasi metabolisme komponen matriks ekstra seluler yaitu sabut kolagen, elastin dan hyaluronic acid (Thornton MJ, 2013).

Pada periode menopause penurunan estrogen mengakibatkan jumlah komponen matriks ekstra seluler menurun. Kulit menjadi lebih tipis, elastisitas berkurang dan terjadi peningkatan kerutan. Selain itu kulit menjadi lebih kering, vaskularisasi menurun dan berkurangnya pertahanan terhadap stres oksidatif (Thornton MJ, 2013). Banyak dari efek ini dapat dibalikkan dengan penggantian estrogen yang meningkatkan hidrasi epidermis, elastisitas kulit dan ketebalan kulit serta mengurangi kerutan kulit dengan menambah kandungan dan kualitas kolagen.

2.2 Tinjauan Tentang Fitoestrogen

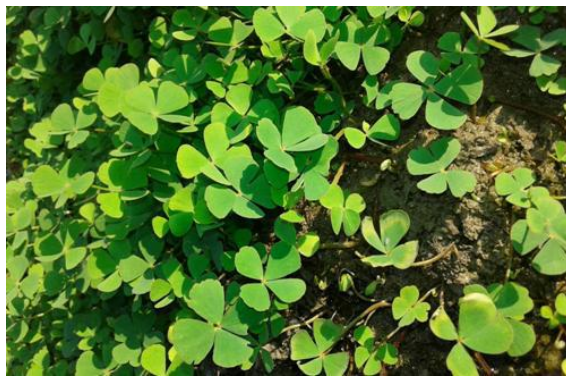
Penggunaan bahan alami yang mengandung hormon atau fitohormon sudah banyak dikembangkan saat ini, salah satunya adalah fitoestrogen (Glover dan Assinder, 2006). Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki sifat dan khasiat yang sama dengan hormon estrogen atau dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen (Biben, 2012). Fitoestrogen banyak ditemukan pada tanaman kelompok biji-bijian, buah-buahan dan sayuran. Secara structural dan fungsional, fitoestrogen serupa dengan 17β estradiol dan merupakan senyawa difenolik non-steroid (Kuntana, 2005). Dekomposisi alami ini ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten. Penggunaan fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti (*hormonal replacement therapy/HRT*) (Achdiat, 2003).

Pada tanaman dikenal beberapa kelompok fitoestrogen yaitu; isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti *flavones*, *chalconcs*, *diterpenoids*, *triterpenoids*, *coumarins* dan *acyclics* . Pada kelompok fitoestrogen tersebut isoflavon merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan, dikarenakan kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi (Achdiat, 2003). Genistein adalah isoflavon yang paling penting. Kesamaan struktural dengan 17β -estradiol menjelaskan efek seperti estrogen (Sator, Schmidt, Rabe, & Zouboulis, 2004). Genistein telah diuji di persiapan kosmetik anti aging dan telah menunjukkan hasil untuk elastisitas kulit dan pencegahan kanker kulit. Kosmetikkrim yang mengandung genistein (aglikon) telah digunakan untuk meningkatkan kulit kering dan keriput (Rona, Vailati, & Berardesca, 2004). Para

peneliti telah mengeksplorasi mekanisme penundaan genistein penuaan kulit, dan ditemukan bahwa genistein meningkatkan ketebalan kolagen kulit dengan menginduksi ekspresi VEGF subkutan dan meningkatkan TGF- β di kulit. Genistein juga menghambat MMPs dengan meningkatkan kadar protein TIMP, yang pada gilirannya menurunkan degradasi kolagen. Oleh karena itu, genistein dapat secara signifikan meningkatkan ketebalan kolagen dan menunda penuaan kulit (Polito et al., 2012).

2.3 Tinjauan *M. crenata*

2.3.1 Klasifikasi *M.crenata*



Gambar 2.1 Tanaman Semanggi (*M. crenata*)

Divisi	: Pteridophyta
Kelas	: Filicinae
Bangsa	: Salviniiales
Suku	: Marsileaceae
Marga	: <i>Marsilea</i>
Jenis	: <i>Marsilea crenata</i> C Presl.
Nama umum/dagang	: Semanggi
Nama daerah	: Semanggi (Jawa)

(Afriastini, 2003)

2.3.2 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 semanggi tertanam dalam substrat di dasar perairan. *Sporocarps* yang 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).

2.3.3 Kandungan Tanaman Semanggi (*Marcilea crenata*)

Daun dan batang Semanggi (*Marsilea crenata* C Presl.) mengandung saponin dan polifenol (Herlina, 2011). Yacoeb, *et al.* (2010) menyatakan bahwa pada Tanaman Semanggi segar terdapat kandungan fitokimia berupa gula pereduksi, steroid, kandungan karbohidrat, dan flavonoid. Menurut Astuti (2013), komponen bioaktif pada ekstrak metanol semanggi meliputi komponen steroid, saponin, alkaloid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino.

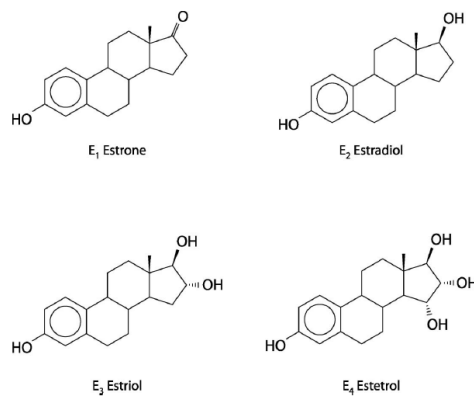
2.3.4 Manfaat Tanaman Semanggi (*Marcilea crenata*)

Masyarakat Jawa memanfaatkan daun semanggi muda sebagai bahan pangan. Semanggi muda banyak digunakan sebagai campuran pecel di daerah Surabaya. Pemanfaatan semanggi tidak hanya sebagai bahan pangan saja, daun dan batang semanggi juga dapat digunakan sebagai peluruh air seni (Afriastini 2003). Daun semanggi air (*Marselia crenata*) memiliki kandungan bioaktif yaitu isoflavon

yang termasuk flavonoid glycosida termasuk di dalamnya adalah genistein dan deidzein sehingga digunakan sebagai fitoestrogen (Glover and Assinder, 2006). Kandungan flavonoid pada tanaman ini juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiradang, antitumor, dan mencegah osteoporosis (Yakob, 2010).

2.4 Tinjauan Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid dengan 10 atom C dan dibentuk terutama dari 17-ketosteroid androstenedion. Estrogen alamiah yang terpenting adalah estradiol, estron dan estriol. Secara biologis, estradiol adalah yang paling aktif dan paling banyak dalam tubuh yaitu dengan perbandingan khasiat biologis berturut-turut dari ketiga hormon tersebut (estradiol, estron dan estriol) yaitu 10 : 5 : 1. Potensi estradiol yakni 12 kali dari potensi estron dan 8 kali dari potensi estriol sehingga estradiol dianggap sebagai estrogen utama (Speroff *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Struktur estrone (E₁), Estradiol (E₂), Estriol (E₃) dan Estetrol (E₄) (Coelingh Benning *et al.*, 2008).

Selain di ovarium, estrogen juga di sintesis di adrenal, testis, plasenta, jaringan lemak dan susunan saraf pusat namun dalam jumlah yang kecil. Hal ini menyebabkan wanita mempunyai kadar estrogen yang rendah setelah menopause (Baziad, 2003). Estrogen memiliki fungsi secara umum yaitu sebagai perangsang

sintesis DNA melalui pembentuk utusan RNA (*messenger RNA*), sehingga terjadi peningkatan sintesis protein (Iswahyuni, 2011).

Estrogen mengurangi respon inflamasi, seperti pada penekanan produksi beberapa mediator proinflamasi termasuk ekspresi protein dan kadar IL-1b, IL-6, dan TNF α (Lewis *et al.*, 2008; Khaksari *et al.*, 2011; Asl *et al.*, 2013). Selain itu, sebagai antiinflamasi, estrogen juga dapat menghambat ekspresi MMP-9 dan siklooksigenase (Lewis *et al.*, 2008). Estrogen memiliki peran dalam gangguan neurodegeneratif seperti *Alzheimer disease* (AD) dan *Parkinson disease* (PD) (Cersosimo, and Benarroch, 2015). 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). ER β banyak terdistribusi di jaringan otak tikus dewasa (Mitra *et al.*, 2003).

Mekanisme regulasi estrogen khususnya 17 β -estradiol terdiri dari 4 jalur yaitu jalur *ER-dependent, nuclear-initiated estrogen signaling, ER-dependent, membrane-initiated estrogen signaling, The ER-independent pathway* dan *Ligand-independent activation of ER*. Adapun penjelasannya sebagai berikut ini (Cui *et al.*, 2013):

1. *ER-dependent, nuclear-initiated estrogen signaling*

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

2. *ER-dependent, membrane-initiated estrogen signaling*

Pada jalur ini, estrogen berikatan dengan ER di membran. Terdapat dua jenis estrogen di membrane yaitu ER-X dan GPR30. Pengiriman sinyal oleh ER melalui second messengers dengan tiga kemungkinan yaitu translokasi ke nukleus dan berikatan dengan promotor DNA sehingga menghasilkan protein. Kedua yaitu *second messengers* dapat mengaktifkan reseptor membran yang lain seperti reseptor *tyrosine kinase*, *metabotropic glutamate receptors* (mGluRs) dan membuka *ion channels*, sehingga mengakibatkan rangkaian mekanisme dan ekspresi protein lain. Ketiga, *second messengers* dapat mengaktifkan jalur lain melalui aktivitas nontranskripsional.

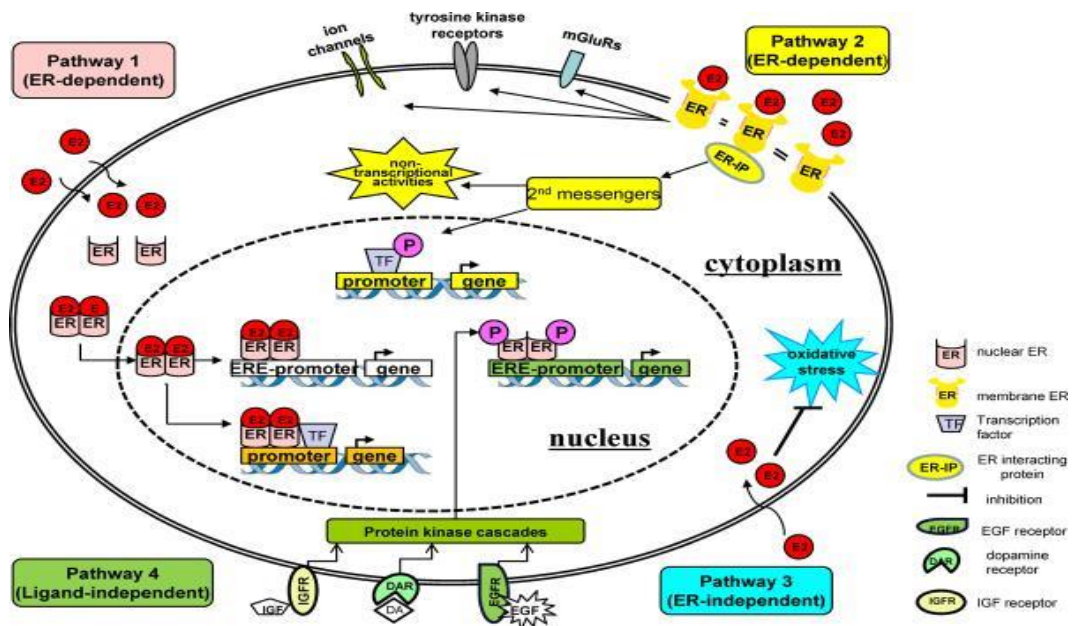
3. *The ER-independent pathway*

Meskipun sebagian besar tindakan biologis estrogen dimediasi melalui ER, namun dalam jalur ini, estrogen tidak berikatan dengan ER. estrogen dapat berperan sebagai agen antioksidan dan menekan stres oksidatif melalui jalur ER-independen.

Estrogen dapat mengatur aktivitas enzimatis untuk melindungi kerusakan sel; Estrogen secara efektif mencegah stres pro-oksidan dengan membatasi pelepasan *Reactive Oxygen species* (ROS) dari mitokondria yang rusak melalui cincin fenolik A dari estrogen.

4. Ligand-independent activation of ER

Dalam kondisi fisiologis normal, ER dapat diaktifkan dengan cara ligan-independen melalui pensinyalan yang dipicu oleh berbagai faktor, termasuk neurotransmitter seperti dopamin, faktor pertumbuhan seperti epidermal growth factor (EGF) dan insulin-like growth factor-1 (IGF-1) dan aktivator jalur sinyal intraseluler tertentu, seperti yang dimediasi oleh kinase PKC, PKA, MAPK dan phosphatidylinositol 3-kinase. Aktivasi jalur ligan-independen terkait dengan fosforilasi ER oleh ikatan protein seluler kinase dan ER teraktivasi akan berikatan dengan EREs dan promotor di DNA sehingga dapat menghasilkan protein tertentu.



Gambar 2.3 Mekanisme jalur pensinyalan estrogen (Cui *et al.*, 2013).

2.5 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).

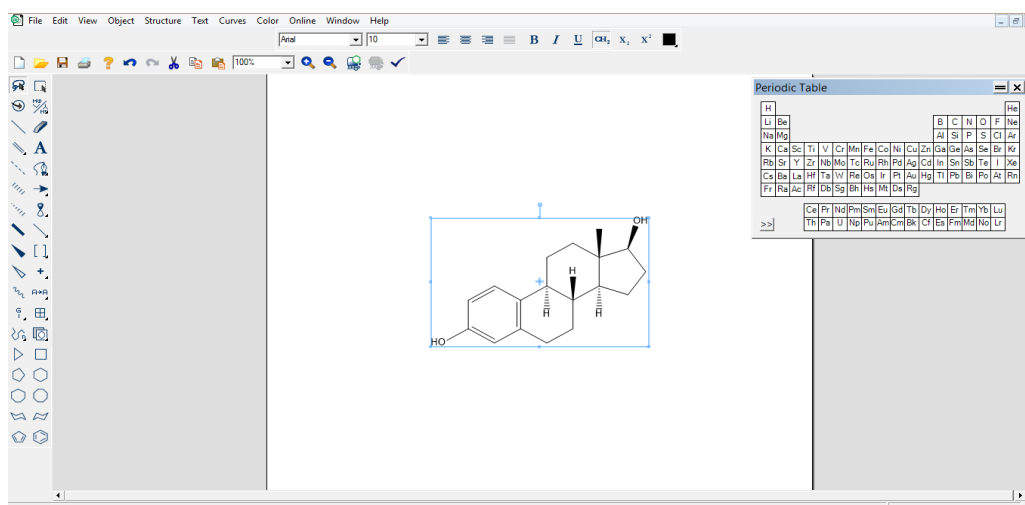
Dalam desain obat modern, *molecular docking* secara rutin digunakan untuk memahami interaksi obat dengan reseptor dan seringkali digunakan untuk memprediksi orientasi ikatan dari kandidat obat pada protein target. Interaksi yang terjadi pada molekul obat dan protein target akan menghasilkan energi ikatan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

2.6 Software Penunjang

2.6.1 Chem Draw

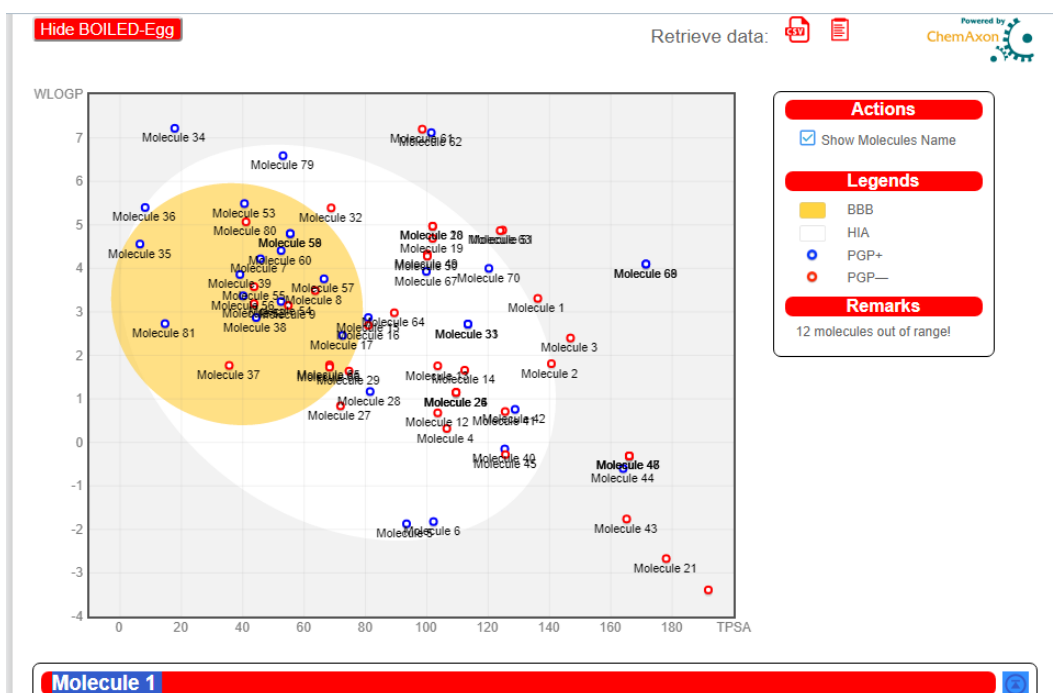
Chem Draw merupakan software kimia dari produk CambridgeSoft.com. Chem Draw memiliki banyak fungsi, diantaranya membuat nama dan struktur senyawa, membuat struktur streokimia dengan benar dari nama kimia, menghitung rumus molekul dan berat molekul, dan mendapatkan nama IUPAC dengan akurat dari struktur. 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).



Gambar 2.4 Tampilan Software Chem Draw

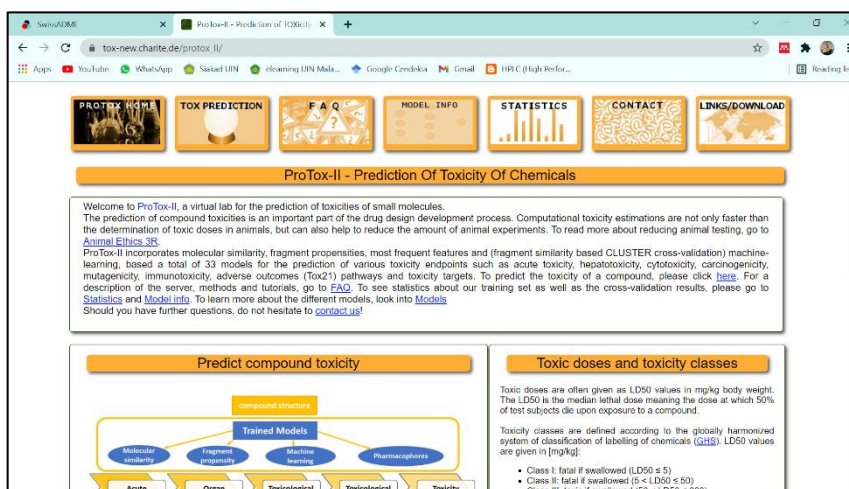
2.6.2 SwissADME

SwissADME merupakan salah satu *software* online yang dapat diakses secara gratis dan dikenal sebagai *physicochemical 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 maupun 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 terabsorpsi hingga dapat menembus BBB (Daina *et al.*, 2017).



Gambar 2.5 Tampilan website swissADME

2.6.3 Protox Online Tools



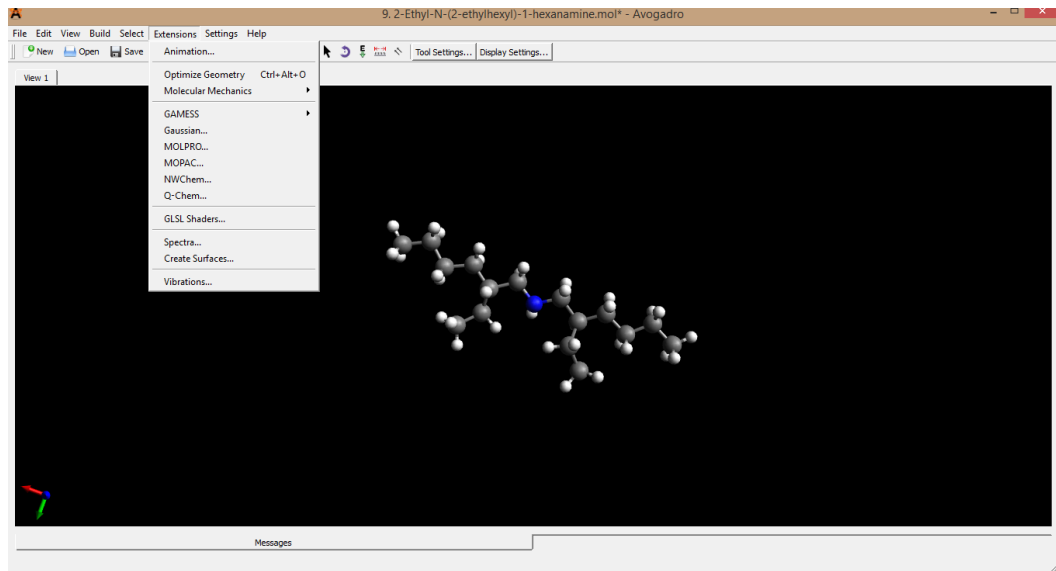
Gambar 2.6 Protox Online Tools

ProTox II adalah jaringan untuk melihat profil keamanan bahan kimia. ProTox II menggunakan struktur 2D sebagai input/output dari keseluruhan karakteristik toksisitas senyawa. Terobosan terbaru dari ProTox II adalah membagi toksisitas menjadi toksisitas organ (hepatotoksikitas), toksisitas oral, titik akhir toksikologi (mutagenik, karsinogenik, imunotoksikitas, sitotoksikitas), toksisitas jalur dan toksisitas target, dan skema prediksi berbagai tingkat lainnya (ProTox-II, 2018).

2.6.4 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 bentuk 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

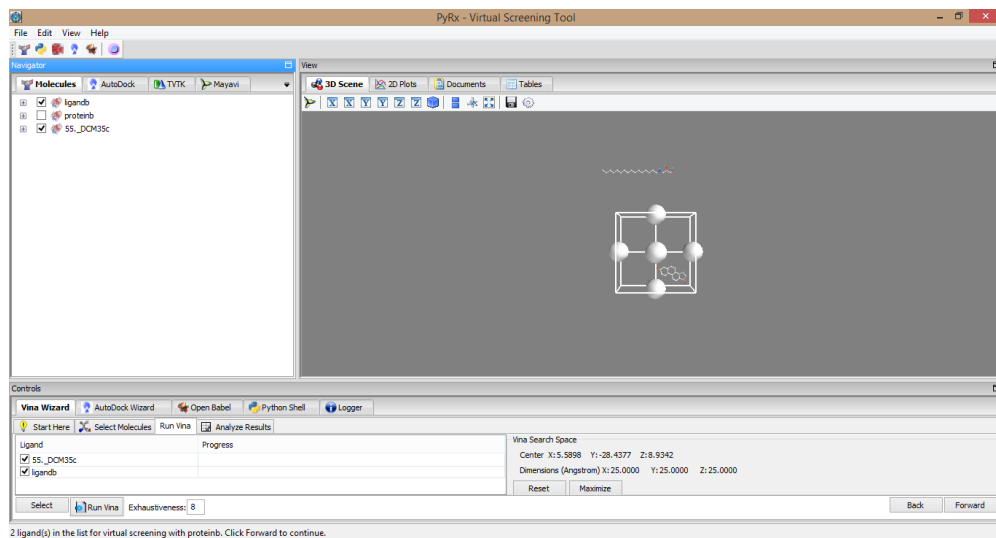
menemukan struktur geometri paling stabil dari struktur kimia sebelum dilakukan penambahan senyawa terhadap targetnya (Hanwel *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 Tampilan Avogadro saat optimasi struktur senyawa

2.6.5 AutoDock Vina

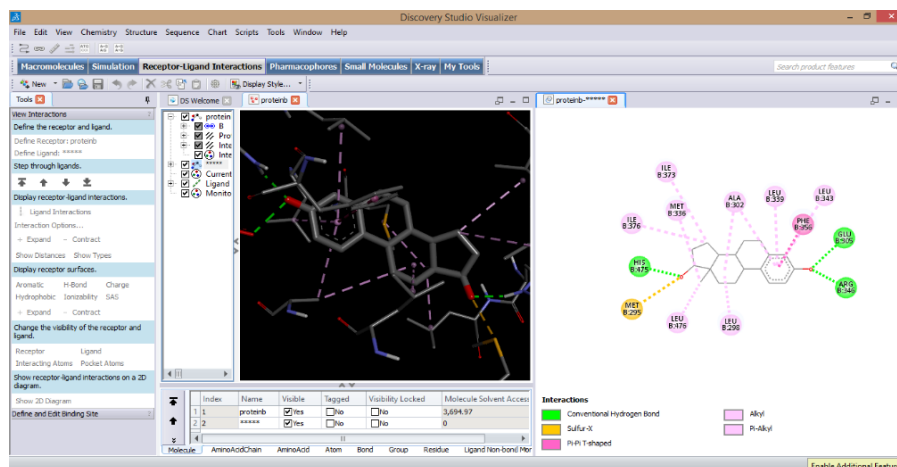
AutoDock Vina merupakan salah satu perangkat lunak yang didapatkan digunakan untuk penambatan molekul dan skrining virtual. Vina memiliki fungsi yang beragam, tingkat kinerja tinggi dan meningkatkan akurasi untuk mempermudah penggunaan (Sandeep *et al.*, 2011). Aplikasi ini dapat memproses penambatan lebih 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).



Gambar 2.8 Tampilan Autodockvina saat proses autogrid

2.6.6 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).

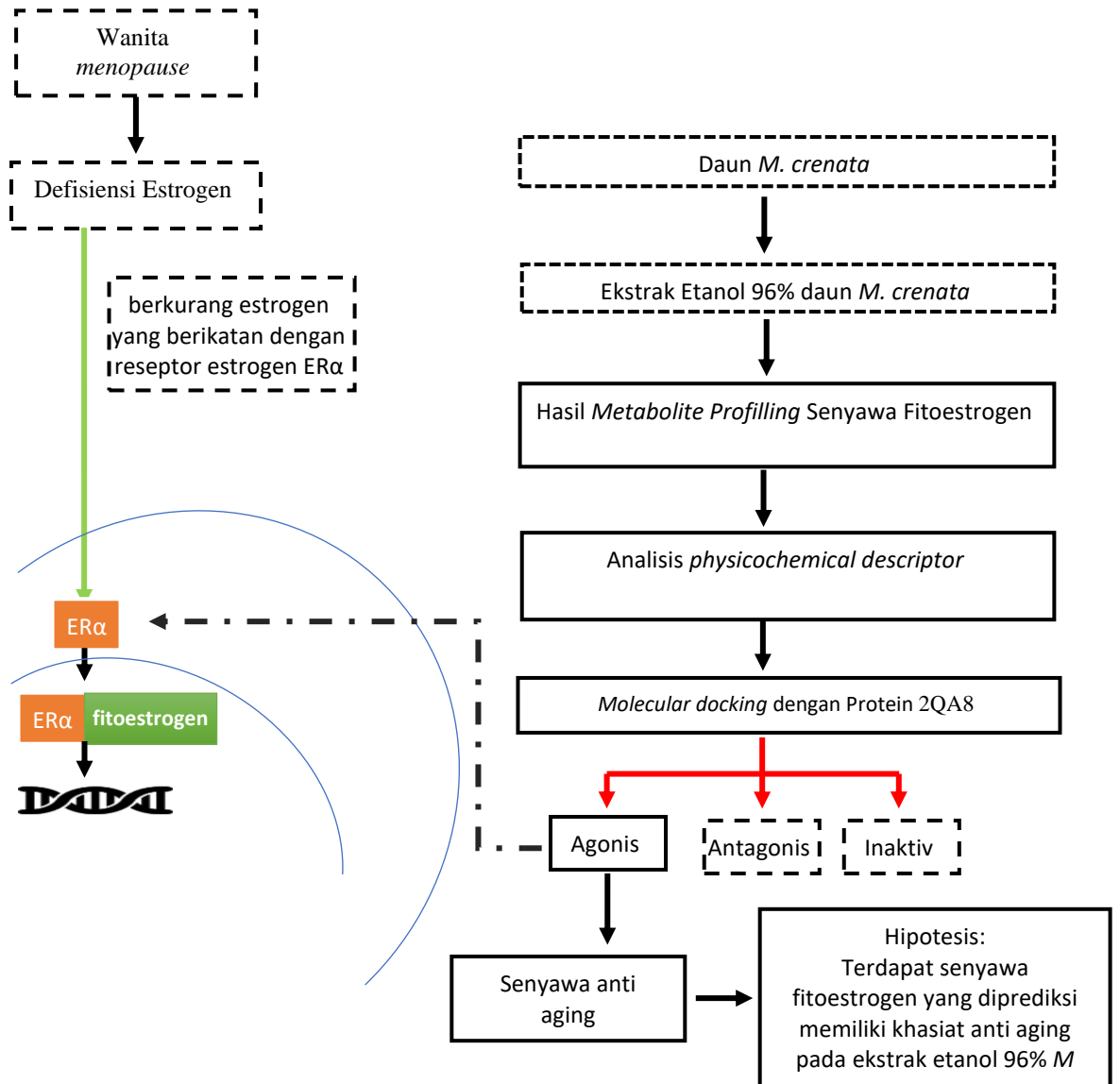


Gambar 2.9 Tampilan Discovery Studio Visualizer saat analisis

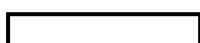
BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

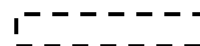


Keterangan:

 : Fokus Penelitian

 : Alur Berpikir

 : Menghambat

 : Pendukung Penelitian

 : Hasil Proses

 : Masuk dan Berikatan

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Terjadi defisien estrogen pada seorang wanita *menopause*, sehingga estrogen receptor yang aktif berkurang atau terhambat karena berkurangnya jumlah estrogen yang berikatan dengan estrogen receptor, transkripsi DNA pada nucleus akhirnya terhambat. Hal tersebut mempengaruhi protein-protein yang berperan pada pembentukan sel kulit, kolagen dan perlindungan sel kulit dari kerusakan akibatnya kulit mengalami penuaan. Untuk mencegah kerusakan sel kulit atau sebagai anti aging digunakan fitoestrogen untuk menggantikan peran estrogen berikatan dengan ER (estrogen receptor). 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 ekstrak etanol 96% *M. Crenata* dengan uji aktivitas anti aging secara *in silico*. Dilakukan *Physicochemical descriptor* untuk mengetahui senyawa yang dapat menembus membran kulit sehingga dapat berikatan dengan reseptor ER α protein *X-ray* dengan ID 2QA8. Apabila terbukti dalam *M. crenata* terdapat senyawa fitoestrogen yang diprediksi memiliki aktivitas anti aging maka dapat dikembangkan menjadi obat anti aging akibat defisiensi hormon estrogen pada wanita *menopause*.

3.3 Hipotesis

Terdapat senyawa fitoestrogen pada ekstrak etanol 96% daun *Marselia crenata* C Presl yang memiliki khasiat anti aging ditandai profil metabolit yang berikatan agonis dengan protein ER 2QA8 pada kulit manusia

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *pre experimental one shot case study* secara *in silico* dari senyawa ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* terhadap ER α pada 2QA8. Untuk uji *in silico* digunakan aplikasi ChemDraw Ultra 12.0, Avogadro 1.2.0, Autodoc Vina, SwissADME, dan *Biovia Discover Studio Visualizer* 2021. Untuk mengetahui toksisitas digunakan aplikasi *Protox online tool* dan SwissADME untuk mengetahui sifat fisikokimia

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini pada bulan Maret hingga Juni 2022. Studi *in silico* dilakukan di Gedung farmasi, Jurusan Farmasi, FKIK, UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu senyawa hasil *metabolit profiling* dari ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata*.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu interaksi yang terjadi antara senyawa hasil *metabolit profiling* ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* terhadap ER α pada 2QA8 yang memiliki aktivitas agonis dan *binding affinity* pada studi *in silico* dan nilai LD₅₀

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini yaitu komputer personal Lenovo AIAQH4R, ChemDraw Ultra 12.0, Avogadro 1.2.0, Autodoc Vina, SwissADME dan Biovia Discover Studio yang digunakan untuk uji *in silico*, *Prottox online tool*.

4.3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun *M. crenata* diperoleh dari daerah Benowo, Surabaya, dan diidentifikasi di Materia Medika, Batu, Malang.
2. Ekstrak etanol 96% merupakan ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi ultrasonik *M. crenata* menggunakan pelarut metanol.
3. Anti aging yang digunakan dengan memanfaatkan aktifitas fitoestrogen ekstrak etanol 96% *M. crenata* yang berikatan dengan ER sehingga menghasilkan ikatan agonis.
4. Hasil *metabolite profiling* etanol 96% *M. crenata* merupakan senyawa-senyawa dalam *M. crenata* yang diperoleh dari hasil interpretasi data spektra menggunakan UPLC-QToF-MS/MS.
5. *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).
6. *Binding Affinity* merupakan kemampuan senyawa untuk dapat berikatan dengan protein target dengan memberikan energi bebas paling stabil.
7. Ikatan agonis adalah interaksi yang terjadi antara ligan dan target yang memberikan efek mirip dengan kerja reseptor yang bisa diamati dari asam amino yang diikat.

8. *Root Mean Square Deviation* (RMSD) merupakan parameter yang digunakan untuk mengevaluasi kemiripan dua buah struktur. Kemiripan diukur berdasarkan perbedaan jarak atom sejenis
9. LD50 (*Lethal Dose* 50) adalah pemberian suatu senyawa atau bahan yang dapat menyebabkan kematian 50% pada kelompok hewan coba
10. Hukum 5 Lipinski adalah suatu aturan yang digunakan untuk mengevaluasi kesamaan senyawa kimia dengan aktivitas farmakologi tertentu memiliki sifat fisikokimia yang dapat menjadikannya obat baru.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat Penelitian

Alat yang *perangkat keras* berupa satu set laptop dengan spesifikasi: *Processor tipe Intel® Core™ i3 Inside™, RAM 4 GB, dan harddisk 500 GB* serta *perangkat lunak sistem operasi Windows™ Seven Ultimate*, Software yang digunakan adalah ChemDraw 15, Avogadro, Biovia Discovery Studio 2016 *Visualizer*, dan *Autodock vina*

4.4.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian terdiri dari Senyawa hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% *M. crenata* dan protein yang digunakan dalam simulasi berbasis komputer adalah protein *XRay* dengan id protein 2QA8 dari RCSB.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Prediksi Sifat Fisikokimia

- 1 Diubah senyawa dalam bentuk kode canocial SMILES menggunakan software ChemDraw Ultra 12.0., kemudian di-input dalam web tools SwissADME

- 2 Dilakukan analisis sifat fisikokimia senyawa hasil *metabolite profiling* dengan parameter TPSA dan hukum 5 *Lipinski*.

Tabel 4.1.Parameter Uji Fisikokimia

Hukum 5 Lipinski	Keterangan	Rentang
BM (g/mol)	Berhubungan dengan absorpsi, jika lebih dari 500 dalton akan sulit terabsorpsi.	<500
Log P	Nilai log koefisien partisi oktanol/air.	<+5
<i>Hydrogen Bond Donors</i> (HBD)	Ikatan H donor.	<5
<i>Hydrogen Bond Acceptors</i> (HBA)	Ikatan H reseptor.	<10
Torsion	Ikatan H yang dapat berotasi.	-
<i>Polar Surface Area</i> (PSA)	Daerah permukaan kutub.	<140 Å

4.5.2 Prediksi Toksisitas Senyawa

Prediksi sifat toksisitas senyawa dengan digambar struktur molekul 2D dengan program ChemDraw Ultra 12.0. Kemudian senyawa yang terbentuk diubah dalam bentuk format SMILES. Dalam bentuk format SMILES inilah senyawa diproses untuk memprediksi nilai LD50 berdasarkan *Globally Harmonized System* (GHS) menggunakan *Protox online tool* (http://tox.charite.de/prottox_II/)

Tabel 4.2. Parameter Uji Sitotoksik

Parameter	Keterangan
• Kelas I : ($LD_{50} \leq 5$ mg/kg)	• Fatal jika tertelan
• Kelas II : ($5 < LD_{50} \leq 50$ mg/kg)	• Fatal jika tertelan
• Kelas III : ($50 < LD_{50} \leq 300$ mg/kg)	• Beracun jika tertelan
• Kelas IV : ($300 < LD_{50} \leq 2000$ mg/kg)	• Berbahaya jika tertelan
• Kelas V : ($2000 < LD_{50} \leq 5000$ mg/kg)	• Bisa berbahaya jika tertelan
• Kelas VI : ($LD_{50} > 5000$ mg/kg)	• Tidak beracun

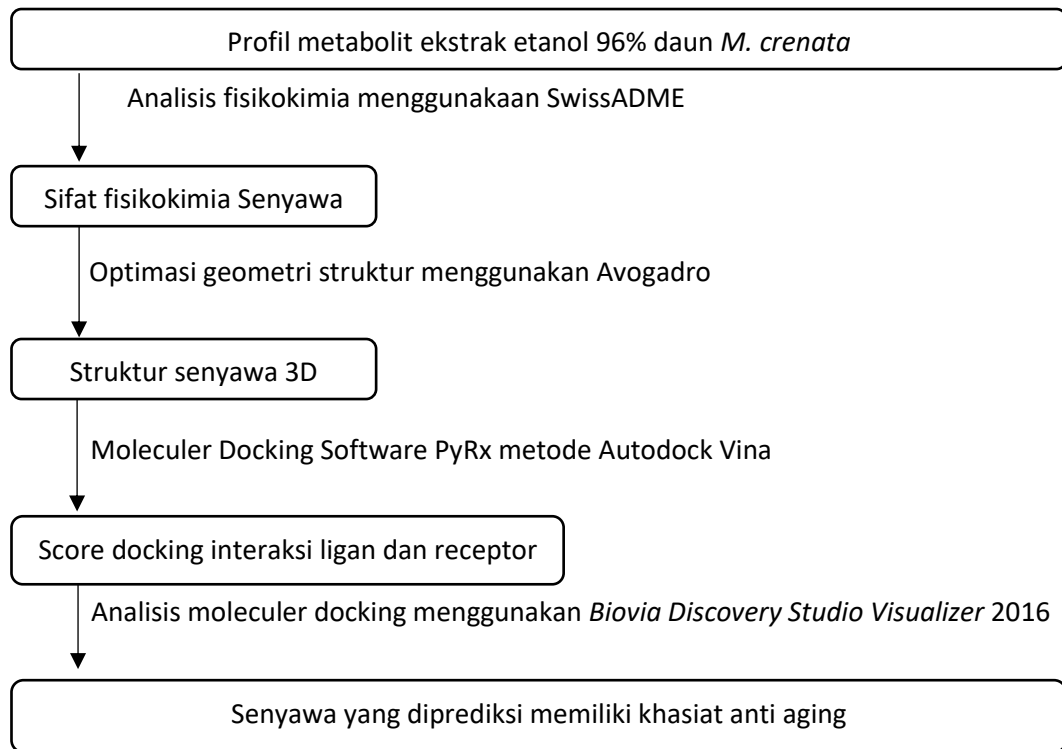
4.5.3 Preparasi Sampel In silico

- 1 Diunduh Protein X Ray dengan ID 3A7B dan 1A52 pada *Protein Data Bank* www.rcsb.org.
- 2 Dilakukan preparasi awal yang bertujuan untuk memecahkan ligan dengan protein menggunakan aplikasi *Biovia Discover Studio Visualizer 2021*.
- 3 Senyawa hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* yang sesuai dengan kriteria dilakukan optimasi geometri struktur menggunakan Avogadro yang berguna untuk mencari energi minimal dengan metode MMFF94.

4.5.4 Penambatan Ligan dan Protein

- 1 Ditambahkan ulang ligan dengan protein 2QA8 untuk melakukan validasi internal supaya didapatkan metode yang tepat dalam melakukan penambatan senyawa inklusi hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata*.
- 2 Senyawa inklusi hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata*. dilakukan penambatan dengan aplikasi PyRx 0.8 metode Autodock Vina.
- 3 Hasilnya kemudian dianalisis menggunakan *Biovia Discovery Studio Visualizer 2021* untuk mengetahui interaksi senyawa yang terjadi, jenis ikatan dan jarak farmakofor.

4.6 Skema Penelitian



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Preparasi Senyawa

Senyawa yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari penelitian *Ma'arif*, 2020 yang melakukan *metabolite profiling* pada ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* menggunakan UPLC-QToF-MS/MS dan menghasilkan 43 senyawa. Senyawa tersebut di gambar struktur 2D menggunakan aplikasi Chemdraw. Selanjutnya, pada menu edit terdapat *repeat SMILES* yang merupakan notasi kimia yang dirancang khusus untuk ahli kimia dalam penggunaan komputer. Senyawa hasil *metabolite profiling* kemudian diuji sifat fisikokimianya, untuk menentukan karakter senyawa dalam melewati membran sel menggunakan dasar hukum lima Lipinski. Pengecekan sifat fisikokimia senyawa menggunakan *webtools* SwissADME dan hasilnya dapat dilihat pada lampiran . terdapat dua belas senyawa yang tidak diambil pada tahap selanjutnya yaitu senyawa dengan nomor 7, 8, 28, 29, 31, 32, 36, 37, 38, 39, 40, dan 41. Hal ini dikarenakan senyawa-senyawa tersebut tidak memenuhi hukum lima Lipinski. Senyawa yang telah melewati seleksi sifat fisikokimia kemudian diseleksi berdasarkan toksisitasnya untuk menilai kemungkinan adanya toksisitas dan resiko-resiko yang dapat muncul dari senyawa uji yang dapat mengakibatkan efek yang tidak diinginkan pada manusia (Kesuma dkk., 2018).

Berikut merupakan table sifat fisikokimia senyawa yang telah terseleksi karena tidak memenuhi standar Lipinski :

Tabel 5.1 Senyawa yang tidak memenuhi standar Lipinski

No	Nama Senyawa	lipinski	HBA	HBD	TPSA	LOG P	BM
7	N-Benzyl-2-cycloheptyl-2-{4-[(4-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-9H-pyrido[2,3-b]indol-9-yl)methyl]phenyl}acetamide	No	2	1	46.92	5.08	519.72
8	(4E)-N-[2,4-Bis(2-methyl-2-butanyl)phenyl]-4-[[4-(diethylamino)phenyl]imino]-1-oxo-1,4-dihydro-2-naphthalenecarboxamide	No	3	1	61.77	4.97	563.77
28	4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-6-hydroxy-1-oxo-1,3-dihydronaphtho[2,3-c]furan-5-yl hexopyranoside	No	11	5	164.37	1.79	498.44
29	(5E)-5-[4-(2,4-Dinitrophenoxy)-3-methoxybenzylidene]-1-(4-methoxyphenyl)-2,4,6-(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione	No	10	1	185.81	2.26	534.43
30	2,3-Dimethoxy-5-propylphenol	No	3	1	38.69	2.67	196.24
31	"Manzamine J"	No	4	3	64.18	4.23	550.78
32	6-O-(N-(((2-Methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl)-D-leucyl)- α -D-allopyranose	No	9	5	154.78	2.64	393.43
36	2-(((3 β ,7 β ,8 ξ ,9 ξ ,10 α ,12 β ,13 α ,14 ξ ,17 α ,20S)-3-[[2-[[3-Acetyl-2-methyl-4-quinolinyl]amino)methyl]phenyl]ethynyl)-3,7,12-trihydroxy-24-oxocholan-24-yl)amino)ethanesulfonic acid	No	9	5	182.50	5.19	805.07
37	Asparaginyphenylalanylarginylarginine	No	9	12	317.51	-0.44	591.66
38	N2-(((2S)-1-((3a'R,6a'S)-1'-(Cyclopropylcarbonyl)-2'-oxohexahydro-4'H-spiro[cyclobutane-1,3'-pyrrolo[3,2-b]pyrrol]-4'-yl)-3-methyl-1-oxo-2-butanyl)carbonyl)-N,N-dimethyl-L-valinamide	No	6	2	133.12	-0.26	504.04
39	Methyl {{{(9Z)-17-(((2R,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-{{{(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy}tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy)-9-octadecenoyl]amino)acetate	No	14	8	233.93	4.46	693.82
40	N-Acetyl-L-seryl-O-octanoyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-leucinamide	No	8	6	206.02	1.07	619.75
41	N-(((E)-4-Methoxyphenyl)diazonyl)carbonyl]leucylglycine - N-cyclohexylcyclohexanamine (1:1)	No	8	4	141.48	5.69	531.69

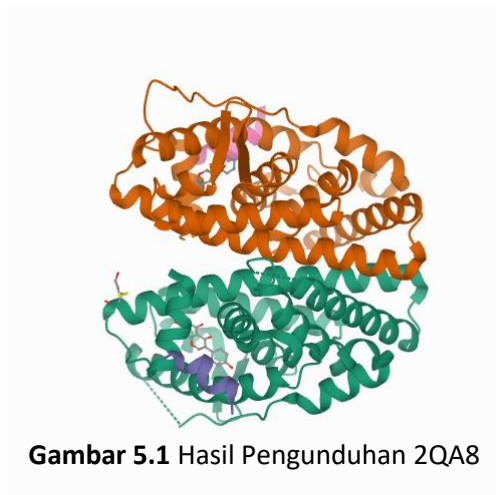
Toksistas suatu senyawa diketahui dengan memasukkan senyawa dalam format *SMILES* ke dalam web *Protox Online Tool*. Sehingga diketahui nilai LD50 dan diprediksi kelas toksistasnya. Tujuan pencarian nilai LD50 adalah untuk mencari dosis tunggal yang mampu membunuh 50% hewan coba dalam satu kali pemberian sehingga dapat melihat potensi toksistas senyawa tersebut (Nurmianti

dkk., 2020). Hasil seleksi toksisitas, terdapat 8 senyawa yang tidak diambil untuk tahap selanjutnya dengan nomor 5, 6, 11, 20, 21, 23, 33, dan 35 (Lampiran). Hal ini dikarenakan senyawa-senyawa tersebut memiliki nilai LD50 pada kelas 2 dan 3. Senyawa dikatakan toksik apabila berada dalam kelas toksisitas I, II, dan III (Drwal *et al.*, 2014). Semakin besar nilai yang ditunjukkan oleh LD50 maka senyawa tersebut semakin aman bagi tubuh (El-Din *et al.*, 2016).

5.2 Preparasi Sampel *In Silico*

Molecular docking merupakan metode yang digunakan dalam biologi molekuler struktural dengan bantuan komputer. Tujuan dari *docking* protein dan ligan yakni untuk memprediksi interaksi antara ligan dengan protein target serta menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu pada struktur tiga dimensi (Mukesh dan Kumar, 2011). Protein yang digunakan diambil dari *protein data bank* (www.rcsb.org) dengan ID 2QA8 menggunakan format pdb (Burley *et al.*, S.2017), yang menjadi salah satu bentuk protein yang mengandung reseptor estrogen yaitu ER α , sehingga senyawa yang diinginkan dapat diprediksi aktivitasnya sebagai antiaging.

Protein dengan ID 2QA8 dipilih karena mengandung reseptor estrogen yaitu ER α . Efek antiaging timbul karena pada kulit reseptor estrogen aktif karena berikatan dengan hormone estrogen, sehingga dapat mengatur fisiologi kulit dengan bekerja pada keratinosit, fibroblas, melanosit, folikel rambut dan kelenjar sebaceous (Thornton MJ, 2013).



Gambar 5.1 Hasil Pengunduhan 2QA8

Preparasi reseptor target selanjutnya dilakukan dengan aplikasi Biovia Discovery Studio 2021 untuk memisahkan reseptor dan *native ligand* dari 2QA8. *Native ligand* tersebut kemudian dilakukan optimasi geometri menggunakan aplikasi Avogadro dengan metode MMFF94 Sehingga siap dilanjutkan dengan pendocking (Meily, A., dan Purwanto, A., 2021).

Preparasi 23 senyawa hasil *metabolite profiling* yang telah diseleksi sifat fisikokimia dan toksisitasnya berperan sebagai ligan dilakukan dengan cara menggambar struktur 2D menggunakan aplikasi Chemdraw dan disimpan dalam format MOL file, hasilnya dimasukkan pada aplikasi Avogadro untuk dilakukan optimasi geometri menggunakan metode MMFF94 agar didapatkan struktur yang stabil. Kemudian 23 senyawa tersebut disimpan dengan format SYBYL mol2 dan dapat dilanjutkan dengan pendocking.

5.3 Penambatan Ligan dan Protein

Penambatan ligan dan reseptor dilakukan terlebih dahulu sebagai langkah validasi internal. Validasi internal berfungsi untuk memperoleh aplikasi yang sesuai untuk digunakan pada *molecular docking* (Shofi, 2021). Validasi internal digunakan untuk mengetahui nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) antara

ligan dengan protein. Nilai RMSD menjadi parameter untuk mengevaluasi aplikasi *docking* yang digunakan, sudah sesuai atau tidak berdasarkan seberapa besar perubahan interaksi protein-ligan pada struktur kristal sebelum dan sesudah *docking* (Muttaqin, F.Z. dkk., 2019). Selain nilai RMSD, parameter lain yang dilihat yaitu *binding affinity* yang berguna untuk melihat ukuran kemampuan obat untuk berikatan dengan reseptor (Saputri, K. E., dkk., 2016).

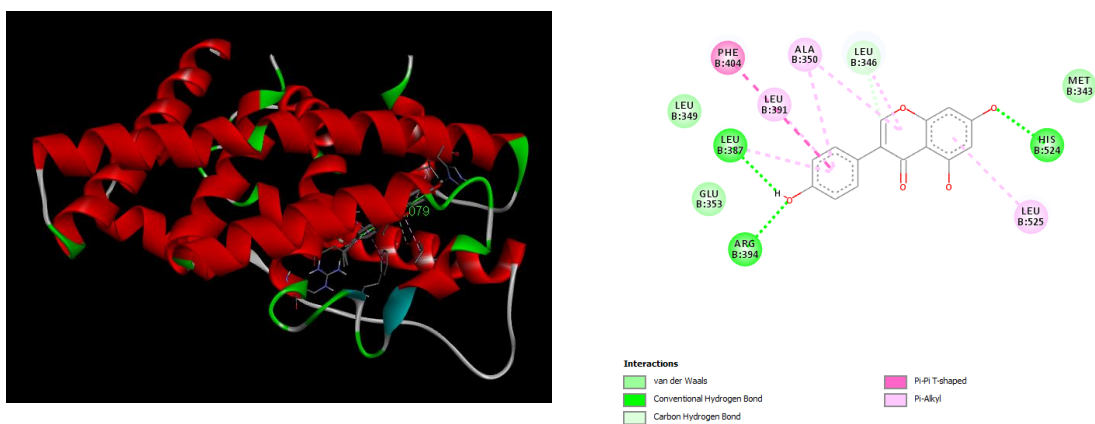
Tabel 5.2 Hasil Validasi Internal Autodock Vina ID 2QA8

Binding Affinity	RMSD/ Upper	RMSD/ Lower	Rata-rata RMSD	Asam Amino (Jenis Ikatan)	Jarak Farmakofor
-10.0	0.0	0.0	0	HIS524 (Hidrogen) LEU387 (Hidrogen)	12.057
-9.3	2.368	1.12	1.744		
-7.8	2.373	0.999	1.686		
-7.4	1.434	1.212	1.321		
Rata-rata RMSD Autodock Vina			1.584		

Hasil rata rata nilai RMSD pada 2QA8 diperoleh 1.584 Å membuktikan bahwa aplikasi Autodock Vina dapat digunakan untuk proses *molecular docking*. Suatu metode *docking* dikatakan valid apabila nilai $RMSD \leq 2\text{Å}$ artinya semakin dekat posisinya dengan menduduki *native ligand* sehingga metode yang digunakan akan lebih tepat, yang berarti parameter *docking* yang digunakan telah valid sehingga dapat digunakan selanjutnya untuk *docking* senyawa uji (Muttaqin, F.Z. dkk., 2019).

Hasil *binding affinity* pada ER α dan genestein (2QA8) sebesar -9,3. Nilai yang dihasilkan menunjukkan ikatan ER α dan genestein sangat baik karena semakin kecil nilai *binding affinity* maka, afinitas antara reseptor dengan ligan semakin tinggi ikatan yang terbentuk semakin stabil dan baik dan berpengaruh pada hasil yang diperoleh (Saputri, K. E., dkk., 2016).

Asam amino yang terbentuk pada reseptor 2QA8 yaitu HIS (524) dan LEU (387) dengan ikatan yang terjadi dalam hasil validasi internal yaitu jenis ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang terbentuk antara atom hidrogen dengan atom lain yang memiliki nilai keelektronegatifan tinggi sehingga dapat berikatan kuat dengan reseptor dan menghasilkan reaksi (respon biologis) (Syahputra *et al.*, 2014)



Gambar 5.2 Hasil visualisasi *native ligand* pada 2QA8.

5.4. *Molecular Docking*

Proses *molecular docking* senyawa ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* dilakukan dengan menggunakan aplikasi PyRx 0.8 dengan metode Autodock Vina. Proses *molecular docking* dilakukan dengan mengamati kesesuaian antara reseptor dan ligan seperti “*lock and key*”. Suatu ligan (*key*) hanya akan memberikan efek yang diinginkan apabila berikatan dengan reseptor (*lock*) tertentu (Hairunisa, dkk., 2019). Parameter yang digunakan untuk menentukan senyawa yang berpotensi sebagai antiaging pada *molecular docking* ini yaitu senyawa mengikat dua asam amino yang sama dengan *native ligand* yaitu HIS (524) dan LEU (387). Kemudian jarak farmakofor berfungsi mengetahui jarak

antar gugus farmakofor yang juga bertanggung jawab terhadap kemiripan farmakologi (Riaz *et al.*, 2018). Nilai jarak farmakofor yang diperbolehkan yaitu yang memiliki selisih 1,0 dari ligan asli (Muchtaridi *et al.*, 2018; Riaz *et al.*, 2018).

Parameter yang diamati selanjutnya yaitu *binding affinity*, yang berguna untuk mengamati kemampuan obat dalam mengikat reseptor (Saputri, K. E., dkk., 2016), semakin kecil nilai *binding affinity* menunjukkan semakin stabil konformasi senyawa dengan reseptor maka semakin kecil energi yang dibutuhkan untuk berikatan (Harish *et al.*, 2013; Kastritis, 2012; Siswandono, 1995).

Berikut merupakan tabel hasil *molecular docking* senyawa yang diprediksi dapat berikatan dengan ER α menggunakan aplikasi PyRx 0.8 dengan metode Autodock Vina. Dari table berikut dapat diketahui senyawa yang diprediksi sebagai antiaging

Tabel 5.3 Hasil *molecular docking*

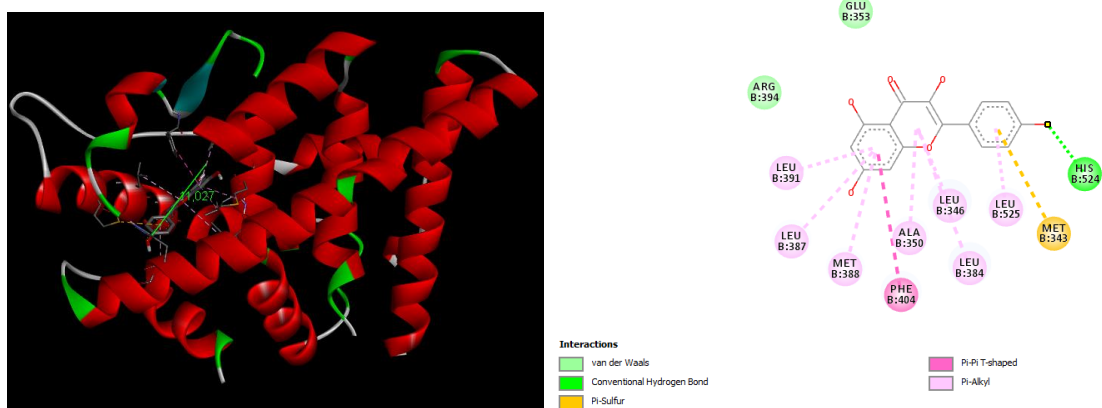
No	Rumus Molekul	Binding aviniti	RMSD	Asam Amino	Farmakofor
1	Kaempferol	-8,9	1.847	HIS (524) LEU (387)	11.27
2	Cetylamine	-6,3	1.816	HIS (524) LEU (387)	6.601
3	2,2'-(Tridecylimino) diethanol	-6,5	1.897	HIS (524) LEU (387)	8.436
4	(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid	-7,1	1.971	HIS (524) LEU (387)	11.947
5	2-Deoxy-2-(((2-methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl)amino)-D-glucopyranose	-7,1	1.674	HIS (524) LEU (387)	10.858
6	2-(4-Chloro-3-ethyl-1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-5-(propylsulfanyl)-1,3,4-thiadiazole	-6,5	1.78	HIS (524) LEU (387)	8.11
7	Octadecyl 2-acetamido-2-deoxyhexopyranoside	-3,3	1.520	HIS (524) LEU (387)	9.128

Berdasarkan analisis parameter dan hasil yang diperoleh, maka hasil dari *molecular docking* senyawa hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun

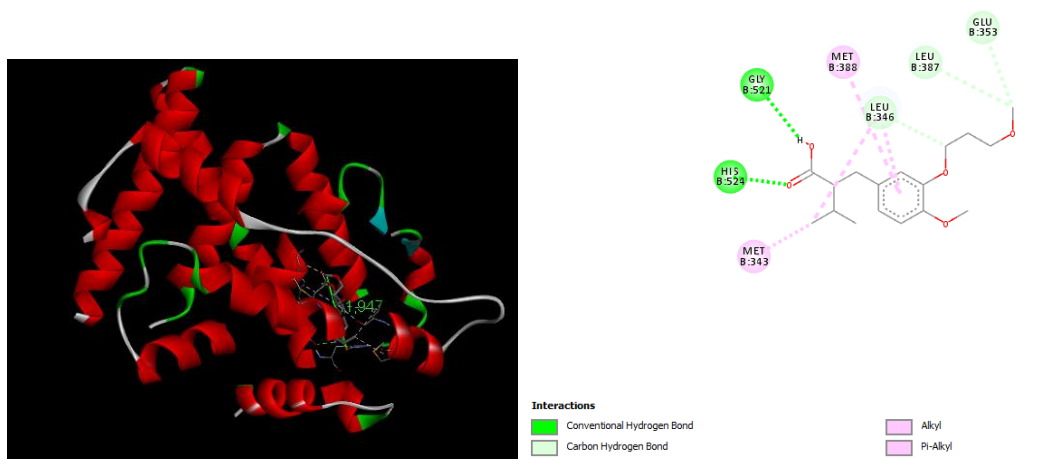
Marsilea crenata C Presl yaitu terdapat 2 senyawa yang agonis terhadap protein 2QA8 yang diprediksi dapat memberikan efek antiaging yaitu *Kaempferol* dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid*.

Kaempferol dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* dari data hasil *molecular docking* memiliki 2 asam amino HIS (524) dan LEU (387) serta jarak farmakofor dengan selisih 0,78 untuk *Kaempferol* dengan genistein serta 0,11 untuk selisih *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* dengan genistein. Kesamaan asam amino dan selisih jarak farmakofor kurang dari 1 ini menggambarkan aktivitas farmakologi semakin mirip.

Nilai *binding affinity* dari kedua senyawa tersebut menunjukkan bahwa *Kaempferol* dengan nilai -8,9 lebih stabil konformasi senyawa dengan reseptor dan semakin kecil energi yang dibutuhkan untuk berikatan, daripada *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* dengan nilai -7,1 akan tetapi *Kaempferol* tidak lebih baik dari Genistein sebagai Ligan pembanding dengan nilai *binding affinity* -9,3



Gambar 5.3 Hasil visualisasi *Kaempferol* pada 2QA8.



Gambar 5.3 Hasil visualisasi *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* pada 2QA8.

Pengecekan sifat fisikokimia senyawa *Kaempferol* dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* menggunakan *webtools* SwissADME hasilnya dapat dilihat pada table berikut :

Tabel 5.4 Hasil analisis Fisikokimia senyawa dengan SwissADME

No	Nama Senyawa	% Area	HBA	HBD	TPSA	LOG P	BM	LD 50 (mg/kg)	Kelas
1	Kaempferol	0.1725	6	4	111.13	1.70	286.24	3819	5
2	<i>(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid</i>	0,871	5	1	64.99	3.09	310.39	2580	5

Analisis fisikokimia yang dilakukan adalah dengan parameter hukum 5 Lipinski. Hukum ini memprediksi kemiripan senyawa dengan aktivitas biologis tertentu yang dirancang untuk pemberian dengan rute oral (Daina *et al.*, 2016). Hasil pengecekan ikatan-H aseptor (HBA) dinyatakan dengan jumlah atom O dan N yaitu pada kedua senyawa tidak lebih dari 10 dan begitu juga ikatan-H donor (HBD) yang dinyatakan dengan jumlah gugus O-H dan N-H tidak lebih besar dari

5, hal ini menyatakan bahwa energi yang dibutuhkan kedua senyawa dalam proses absorbs telah memenuhi standar (Lipinski *et al.* 1997).

Kaempferol dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* memiliki berat molekul kurang dari 500 g/mol sehingga dapat berdifusi menembus membran sel dengan baik. Hal ini diperkuat dengan nilai TPSA sebagai parameter dalam menembus membran sel tubuh kedua senyawa ini kurang dari 140 Å (Chagas *et al.*, 2018). Hasil koefisien dalam air atau lemak digambarkan dengan nilai LOG P kedua senyawa kurang dari 5, semakin besar nilai LOG P semakin hidrofobik senyawa tersebut sehingga toksisitasnya cenderung tinggi, karena senyawa akan tertahan lama pada lipid bilayer, sehingga terdistribusi lebih luas didalam tubuh yang mengakibatkan selektivitas ikatan terhadap enzim target akan berkurang (Lipinski *et al.* 1997).

Hasil uji toksisitas senyawa dapat dilihat bahwa keduanya pada kelas 5 ($2000 < LD50 \leq 5000$ mg/kg). Senyawa dikatakan toksik apabila berada dalam kelas toksisitas I, II, dan III (Drwal *et al.*, 2014). Semakin besar nilai yang ditunjukkan oleh LD50 maka senyawa tersebut semakin aman bagi tubuh (El-Din *et al.*, 2016).

5.5. Potensi Agen antiAging dari Ekstrak *Marsilea crenata* C

Peran hormon estrogen pada sel kulit adalah berikatan dengan ER sehingga ER aktif. Peran tersebut dapat digantikan genistein ketika wanita mengalami defisiensi estrogen, ER yang aktif dapat mengatur fisiologi kulit dengan bekerja pada keratinosit, fibroblas, melanosit, folikel rambut dan kelenjar sebaceous. Aktifnya ER α dapat meningkatkan penyembuhan luka dan respons imun serta mempertahankan elastisitas dan fleksibilitas kulit (Thornton MJ, 2013). Uji klinis gel 4 % genistein yang diaplikasikan selama 24 minggu pada kulit wanita pasca-

menopause mampu meningkatkan konsentrasi signifikan meningkatkan ketebalan kolagen dan menunda penuaan kulit (Polito et al., 2012).

Ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* memiliki 2 senyawa yang agonis terhadap protein 2QA8 yang diprediksi dapat memberikan efek antiaging yaitu *Kaempferol* dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut memiliki peran sebagai fitoestrogen, karena mirip dengan fitoestrogen genestein ketika berikatan dengan ER α . ER α teraktivasi tersebut dapat merekrut faktor transkripsi dan kofaktor lain untuk urutan target spesifik DNA (Cui et al., 2013) terjadinya proses transkripsi menghasilkan protein protein yang mengatur fisiologi kulit.

Senyawa yang agonis terhadap protein 2QA8 yang diprediksi dapat memberikan efek antiaging yaitu *Kaempferol* dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* tidak dapat digunakan sebagai dasar utama potensi yang terdapat pada *Marsilea crenata* sebagai anti aging karena pesen area kedua senyawa pada Ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* sangat sedikit dan penelitian secara *in silico* ini dilakukan terhadap masing masing senyawa hasil *metabolite profiling* Ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* padahal untuk beberapa senyawa, efek farmakologi tidak dihasilkan oleh senyawa tunggal melainkan melalui sinergisme dari beberapa senyawa. Perlu dilakukan penelitian lanjutan baik secara *in silico*, *in vivo* maupun *in vitro*, agar didapatkan suatu produk obat herbal yang praktis yang dapat digunakan oleh wanita yang mengalami defisiensi estrogen.

5.5 Integrasi Penelitian dengan Kajian Al-Qur'an

Allah pada Al-qur'an surah Qaf ayat 7 berfirman :

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ

Artinya : *Dan Kami hamparkan bumi itu dan Kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata (Qaf :7)*

Menurut tafsir An-Nafahat Al-Makkiyah yang ditulis oleh Syaikh Muhammad bin Shalih asy-Syawi, makna dari kalimat “*dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata*” pada ayat ini ialah, dari seluruh jenis tanaman yang membuat orang-orang yang memandangnya senang dan kagum, menjadikan orang yang memandang tanaman-tanaman itu senang dan tanaman tersebut dimanfaatkan manusia untuk berbagai kepentingannya. Salah satu kebermanfaatannya yang diambil dari keindahan tanaman yang Allah SWT ciptakan ialah dengan melakukan penelitian terhadapnya.

Penelitian yang dilakukan pada tanaman *Marsilea crenata* tidak lain adalah salah satu usaha bagi kita untuk menguatkan keimanan. Dengan mengamati hasil maka kita dapat mengindra bahwa salah satu tumbuhan baik yang diciptakan itu adalah *Marsilea crenata* begitu banyak manfaatnya seperti dikatakan bahwa *Marsilea crenata* mengandung senyawa fitoestrogen yang merupakan senyawa yang dapat menggantikan peran hormone estrogen pada tubuh manusia, penelitian ilmiah saat ini menduga bahwa senyawa fitoestrogen dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan penyakit yang disebabkan oleh defisiensi estrogen. Seperti

yang disebutkan sebelumnya, daun *Marsilea crenata* diprediksi memiliki aktivitas estrogenik sehingga dapat dijadikan sebagai tanaman kandidat obat. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan pada penelitian ini, didapatkan 2 senyawa dari ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* terhadap protein 2QA8 yang bersifat agonis (diprediksi memiliki aktivitas anti aging).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa di dalam tanaman yang Allah ciptakan terdapat manfaat yang dapat diambil oleh manusia, dengan kadar atau ukuran tertentu yang sudah Allah takar. Hal ini sesuai dengan firman Allah pada surah Al-Hijr ayat 19 yang bunyinya:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَوْزُونٍ

Artinya: Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran (Al-Hijr : 19).

Ayat di atas menegaskan bahwa Allah SWT menciptakan beraneka ragam tanam tanaman, masing-masing mempunyai ukuran dan kadar yang ditentukan. Mulai dari kondisi iklim, keadaan daerah hingga kebutuhan manusia dan hewan di sekitarnya. Sementara itu, perbedaan daerah dan tanah tempat tumbuh suatu pohon akan menimbulkan perbedaan rasa dan ukuran buahnya. Contohnya unsur gula di dalam tebu berlainan dengan unsur gula dalam air kelapa, berlainan manisnya dengan mangga dan jeruk. Buah salak sewaktu masih berupa putik dikelilingi oleh duri-duri yang tajam, tetapi setelah ia masak, seakan-akan duri-duri itu menguakkan diri, sehingga mudah untuk manusia mengambil buahnya yang rasanya manis. Putik pepaya pahit rasanya sewaktu masih kecil, sehingga manusia tidak mau mengambil

dan memakannya. Semakin besar putiknya itu, semakin berkurang rasa pahitnya, dan semakin dekat pula manusia kepadanya. Setelah masak, buahnya dipetik dan menjadi makanan yang disenangi (Kemenag RI, 2021).

Demikian Allah menciptakan sesuatu dengan ukuran dan kadar yang tertentu, begitupula halnya dengan senyawa fitoestrogen di dalam daun *Marsilea crenata*. Allah SWT menciptakan senyawa mirip estrogen di dalamnya dengan ukuran dan kadar yang berbeda dengan tumbuhan lainnya, sehingga memiliki potensi estrogenik yang berbeda-beda. Tugas kita sebagai manusia ialah senantiasa berikhtiar dengan akal pikiran untuk menggali lebih jauh manfaat dari tanaman yang Allah ciptakan, serta bertambah ketaqwaan dan keimanan di dalam hati melihat kesempurnaan ciptaan-Nya. Maha benar Allah dengan segala firman-Nya.

BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari *molecular docking* senyawa hasil *metabolite profiling* ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* C Presl yaitu

1. Terdapat 2 senyawa yang agonis terhadap protein 2QA8 yang diprediksi dapat memberikan efek antiaging yaitu *Kaempferol* dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid*. Akan tetapi tidak dapat digunakan sebagai dasar utama potensi yang terdapat pada *Marsilea crenata* sebagai anti aging karena pesen area kedua senyawa pada Ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* C Presl sangat sedikit.
2. *Kaempferol* dan *(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid* yang agonis terhadap protein 2QA8 memiliki sifat fisikokimia yang telah memenuhi standar Lipinski sehingga dapat menembus membran kulit dan berikatan dengan ER α . Kedua senyawa juga dalam katagori toksisitas kelas 5 di mana LD50 lebih dari 2000 mg/kg dan kurang dari samadengan 5000 mg/kg

6.2 Saran

Saran berdasarkan penelitian prediksi aktivitas anti ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* secara *in silico* adalah penelitian ini dilakukan secara *in silico* lagi dengan kode *protein* yang berbeda bertujuan menambah prediksi awal senyawa obat dan sangat perlu dilakukan penelitian *in vitro* dan *in vivo* dalam skala laboratorium agar dapat dikembangkan menjadi sebuah produk herbal yang bermanfaat bagi masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Accelrys Enterprise Platform. 2005. *Introduction to the Discovery Studio Visualizer*. San Diego, California, U. S. A: Accelrys Software Inc.
- Adityara, R. A. 2017. Uji trabekula femur mencit betina. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Afriastini, J.J. 2003. *Marsilea crenata* Presl. in Cryptograms : ferns and fern allies.
- 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.
- 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. Neurosurg.* 119:353-361
- Biben, H.A. 2012. Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan keamanan penggunaannya. *Estrogen sebagai sumber hormon alami*. Seminar ilmiah
- Cui, J., Shen, Y, Li, R. 2013. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways durin Ageing: 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).

- Drwal, M. N., Banerjee, P., Dunkel, M., Wettig, M. R., & Preissner, R. (2014). ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic acids research*, 42(W1), W53-W58.
- El-Din, H. M. A., Loutfy, S. A., Fathy, N., Elberry, M.H, Mayla, A.M., Kassem, S. dan Naqvi, A. 2016. Molecular docking based screening of compounds against VP40 from Ebola virus. *Bioinformation*. Volume 12, Nomor 3: 192-196.
- Ekins, S., Mestres, J., Testa, B. 2007. *In silico* Pharmacology for Drug Discovery: Applications to Targets and Beyond. *British Journal Pharmacology*. 152, 21-37.
- Glover A. and Assinder S.J. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Jour. Endoc.* 189: 565-573
- 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).
- Hardjono, S., 2016. Prediksi Sifat Farmakokinetik, Toksisitas dan Aktivitas Sitotoksik Turunan *N-Benzoil-N'-(4-fluorofenil)tiourea* sebagai Calon Obat Antikanker melalui Pemodelan Molekul. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol. 14, No.2 hlm. 246-255
- Herlina, W. 2011. *Kitab Tanaman Obat Nusantara disertai Indeks Pengobatan*. Yogyakarta: MedPress
- Kementrian Agama Republik Indonesia. 2021. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*.

Jakarta: Adhi Aksara Abadi Indonesia.

- 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.
- Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*. Vol 47 (2).
- Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su, W-H., Chen, C-P., Wang, P-H. 2013. Hormone therapy for postmenopausal women And unanswered issue. Elsevier: *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. Vol 2.
- Lipinski, CA., Lombardo, F., Dominy, BW., Feeney, PJ. 2001, Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Volume 46, Nomor 1–3: 3–26
- 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., 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 Prediction Activity with Molecular Docking. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. Vol 4 (6).
- Mukesh, B. dan Kumar, R. 2011. Molecular Docking: a Review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2 (6): 1746-1751.

- Muttaqin, F. Z., Ismail, H., & Hubbi, N. M. 2019. Studi Molecular Docking, Molecular Dynamic, Dan Prediksi Toksisitas Senyawa Turunan Alkaloid Naftiridin Sebagai Inhibitor Protein Kasein Kinase 2-A Pada Kanker Leukemia. *J of Pharmacoscript*, 2(1).
- Nurjanah, Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. Vol 1. (3).
- Onkara, P., Kumar, A. S., Kanakaraju, B., Prasanna, B., Pydisetty, Y., 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.
- Polito, F., Marini, H., Bitto, A., Irrera, N., Vaccaro, M., Adamo, E. B., Altavilla, D. (2012). Genistein aglycone, a soy-derived isoflavone, improves skin changes induced by ovariectomy in rats. *British Journal of Pharmacology*, 165, 994–1005. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01619.x>
- ProTox-II. 2018. *Tox.charite.de* [online]. Diakses pada 1 november 2021. <https://tox.charite.de/protoxII/index.php?site=faq>.
- Rachman, I. A., Soewondo, P., Setiati, S., Kusumawijaya, K., Baziad, A., Witjaksono, J., Sukarya, W. S. and Silvia. 2004. Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause. HTA Indonesia.
- 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 *et al.*, 2011

- Rona, C., Vailati, F., & Berardesca, E. (2004). The cosmetic treatment of wrinkles. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 3, 26–34. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2130.2004.00054.x>
- 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
- Susan Stevenson, Julie Thornton. 2007. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. Dove Medical Press Limited. *Clinical Interventions in Aging* 2007:2(3) 283–297. Department of Biomedical Sciences, School of Life Sciences University of Bradford, Bradford, West Yorkshire.
- Saputri, K. E., Fakhmi, N., Kusumaningtyas, E., Priyatama, D., & Santoso, B. 2016. Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase Dengan Autodock-Vina. *Chimica et Natura Acta*, 4(1), 16-20.
- Thornton MJ. 2005. Oestrogen functions in skin and skin appendages. *Expert Opin Ther Targets*; 9:617-29; PMID:15948678
- Thornton MJ. 2013. Estrogens and aging skin. *Dermato-endocrinology*. 5(2) : 264-70
- 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).
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A. 2016 Esterogens, Neuroinflammation

and Neurogeneration. *Endocrine Society*.

- Widiasari, F. A. 2017. Uji aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula vertebra mencit betina. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Xie C, Jin J, Lu X, Tao J, Wang R and Miao D. 2015. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesencymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency. *Sci Rep* 2015;5(13975):1-18.
- 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.
- Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E. 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. Elsevier : *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol 51.

Lampiran 1. Hasil Seleksi Fisikokimia, Toksisitas Dan Molecular Doking Metabolit Profiling Ekstrak Etanol 96% *M. crenata*

No	Nama Senyawa	Rumus Molekul	SIFAT FISIkokimia							Toksisitas		Molecular docking		
			lipinski	HBA	HBD	TPSA	LOG P	BM	GI absorption	LD 50 (mg/kg)	Kelas	Binding avinititi	rmsd	Farmakofor
1	2-Methyl-2-propanyl (1-carbamimidoyl-4-piperidiny)carbamate hydrochloride (1:1)	C ₁₁ H ₂₃ N ₄ O ₂ Cl	Yes	3	3	91.44	0.00	278.78	High	1568	4	-1,7	1,821	-
2	3-(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)propanoic acid	C ₁₁ H ₂₃ N ₄ O ₂ Cl	Yes	4	2	66.76	2.33	278.34	High	5000	5	-1,7	0	-
3	2-Methyl-2-propanyl [1-({[(2-methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl}amino)cyclobutyl]methyl carbonate	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	Yes	5	1	73.86	3.07	301.38	High	1000	4	-2,1	2	-
4	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Yes	6	4	111.13	1.70	286.24	High	3819	5	-8,9	1,847	11.27
5	Phentermine	C ₁₀ H ₁₅ N	Yes	1	1	26.02	2.18	149.23	High	160	3	-	-	-
6	epi-jasmonic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	Yes	3	1	54.37	1.87	210.27	High	18	2	-	-	-
7	N-Benzyl-2-cycloheptyl-2-{4-[(4-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-9H-pyrido[2,3-b]indol-9-yl)methyl]phenyl}acetamide	C ₃₅ H ₄₁ N ₃ O	No	2	1	46.92	5.08	519.72	Low	-	-	-	-	-
8	(4E)-N-[2,4-Bis(2-methyl-2-butanyl)phenyl]-4-[[4-(diethylamino)phenyl]imino]-1-oxo-1,4-dihydro-2-naphthalenecarboxamide	C ₃₇ H ₄₅ N ₃ O ₂	No	3	1	61.77	4.97	563.77	Low	-	-	-	-	-
9	3-(Benzyloxy)-2-methyl-1,2-propanediol	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	Yes	3	2	49.69	2.16	196.24	High	3000	5	-1,1	0	-
10	12-Aminodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₅ NO ₂	Yes	3	2	63.32	2.60	215.33	High	9000	6	-5,8	1,742	-
11	Cyclazocine	C ₁₈ H ₂₅ NO	Yes	2	1	23.47	2.95	271.40	High	194	3	-	-	-
12	2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol	C ₅ H ₁₃ NO ₂	Yes	3	3	66.48	1.26	119.16	High	1190	4	-	-	-
13	3-Hydroxyandrostane-17-carbonitrile	C ₂₀ H ₃₁ NO	Yes	2	1	44.02	3.08	301.47	High	500	4	-7,7	3,435	-
14	Cetylamine	C ₁₆ H ₃₅ N	Yes	1	1	26.02	4.41	241.46	High	450	4	-6,3	1,816	6.601
15	2,2'-(Tridecylimino)diethanol	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	Yes	3	2	43.70	4.25	247.48	High	1520	4	-6,5	1,897	8.436
16	(2R)-2-[4-Methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-3-methylbutanoic acid	C ₁₇ H ₂₆ O ₅	Yes	5	1	64.99	3.09	310.39	High	2580	5	-7,1	1,971	11.947

17	1-Pentadecanamine	C ₁₅ H ₃₃ N	Yes	1	1	26.02	4.17	227.43	High	450	4	-6	2,703	-
18	3-(Hexadecylamino)-1,2-propanediol	C ₁₉ H ₄₁ NO ₂	Yes	3	3	52.49	4.51	315.53	High	3500	5	-2	2,433	-
19	3-(1-Phenyl-2-pentanyl)phthalate	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	Yes	4	0	80.26	1.74	310.14	High	3000	5	-6	1,631	-
20	2-Hexyl-3,5-dipentylpyridine	C ₂₁ H ₃₇ N	Yes	1	0	12.89	4.91	303.53	Low	68	3	-	-	-
21	Nitromethanesulfinic acid	CH ₃ NO ₄ S	Yes	4	1	102.33	0.02	125.10	High	2000	3	-	-	-
22	(2E)-2,3-Dichloro-2-propen-1-amine	C ₃ H ₅ NC ₁₂	Yes	1	1	26.02	1.64	125.98	High	1950	4	-3,8	1,3	-
23	3,3-Dinitro-1-propanol	C ₃ H ₆ N ₂ O ₅	Yes	5	1	111.87	-0.45	150.09	High	77	3	-	-	-
24	5-(1,2-Dithiolan-3-yl)-N-(3-methylbutyl)pentanamide	C ₁₃ H ₂₅ NO ₅	Yes	1	1	79.70	3.13	275.47	High	3860	5	-7,2	1,875	-
25	2-Deoxy-2-(((2-methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl)amino)-D-glucopyranose	C ₁₁ H ₂₁ NO ₇	Yes	7	5	128.48	1.20	279.29	Low	5000	5	-7,1	1,674	10,858
26	Umbelliferone	C ₉ H ₆ O ₃	Yes	3	1	50.44	1.44	162.14	High	10000	6	-7,3	1,528	-
27	2-(4-Chloro-3-ethyl-1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-5-(propylsulfanyl)-1,3,4-thiadiazole	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Yes	3	0	97.14	3.30	302.95	High	1500	4	-6,5	1,78	8,11
28	4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-6-hydroxy-1-oxo-1,3-dihydronaphtho[2,3-c]furan-5-yl hexopyranoside	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₁	No	11	5	164.37	1.79	498.44	Low	-	-	-	-	-
29	(5E)-5-[4-(2,4-Dinitrophenoxy)-3-methoxybenzylidene]-1-(4-methoxyphenyl)-2,4,6(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O ₁₀	No	10	1	185.81	2.26	534.43	Low	-	-	-	-	-
30	2,3-Dimethoxy-5-propylphenol	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	Yes	3	1	38.69	2.67	196.24	High	2000	4	-6,6	1,733	-
31	“Manzamine J”	C ₃₆ H ₄₆ N ₄ O	No	4	3	64.18	4.23	550.78	High	-	-	-	-	-
32	6-O-(N-(((2-Methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl)-D-leucyl)-α-D-allopyranose	C ₁₇ H ₃₁ NO ₉	No	9	5	154.78	2.64	393.43	Low	1600	4	-	-	-
33	dyclonine	C ₁₈ H ₂₇ NO ₂	Yes	3	0	29.54	3.64	289.41	High	125	3	-	-	-
34	Piperidolate	C ₂₁ H ₂₅ NO ₂	Yes	3	0	29.54	3.34	323.43	High	1040	4	-8,5	2,209	-
35	2,2-Dihydroxy-N,N,N-trimethylethanaminium	C ₅ H ₁₄ NO ₂	Yes	2	2	40.46	-2.74	120.17	High	2000	3	-	-	-
36	2-(((3β,7β,8ξ,9ξ,10α,12β,13α,14ξ,17α,20S)-3-[(2-[[[3-Acetyl-2-methyl-4-quinolinyl]amino]methyl]phenyl)ethynyl]-3,7,12-	C ₄₇ H ₆₁ N ₅ O ₈ S	No	9	5	182.50	5.19	805.07	Low	200	3	-	-	-

	trihydroxy-24-oxocholan-24-yl}amino)ethanesulfonic acid													
37	Asparaginyphenylalanylarginylarginine	C ₂₅ H ₄₁ N ₁₁ O ₆	No	9	12	317.51	-0.44	591.66	Low	-	-	-	-	-
38	N2-((2S)-1-[(3a'R,6a'S)-1'-(Cyclopropylcarbonyl)-2'-oxohexahydro-4'H-spiro[cyclobutane-1,3'-pyrrolo[3,2-b]pyrrol]-4'-yl]-3-methyl-1-oxo-2-butanyl)carbamoyl)-N,N-dimethyl-L-valinamide	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₅	No	6	2	133.12	-0.26	504.04	High	-	-	-	-	-
39	Methyl {[[(9Z)-17-[(2R,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy}tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]-9-octadecenoyl]amino]acetate	C ₃₃ H ₅₉ NO ₁₄	No	14	8	233.93	4.46	693.82	Low	-	4	-	-	-
40	N-Acetyl-L-seryl-O-octanoyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-leucinamide	C ₃₁ H ₄₉ N ₅ O ₈	No	8	6	206.02	1.07	619.75	Low	-	4	-	-	-
41	N-[[[(E)-(4-Methoxyphenyl)diazonyl]carbonyl]leucylglycine - N-cyclohexylcyclohexanamine (1:1)	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₅	No	8	4	141.48	5.69	531.69	Low	2000	4	-	-	-
42	8-Methyl-3-[[[(2-methyl-1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl)]2-(4-morpholinyl)ethyl]amino)methyl]-2(1H)-quinolinone	C ₂₇ H ₄₁ N ₇ O ₂	Yes	7	1	92.17	4.22	495.66	High	5000	5	1,1	1,545	-
43	Octadecyl 2-acetamido-2-deoxyhexopyranoside	C ₂₆ H ₅₁ NO ₆	Yes	6	4	108.25	5.40	473.09	High	5000	5	-3,3	1,520	9,128

