

**ANALISIS POTENSI NANOPARTIKEL *Allium sativum*, *Curcuma mangga*,
DAN *Acorus calamus* SEBAGAI ANTIINFLAMASI SECARA IN-SILICO
DAN IN-VIVO**

TESIS

**Oleh:
FARAH FAUZIA MAULAHIBATI
NIM. 210602210004**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2023

**ANALISIS POTENSI NANOPARTIKEL *Allium sativum*, *Curcuma mangga*,
DAN *Acorus calamus* SEBAGAI ANTIINFLAMASI SECARA IN-SILICO
DAN IN-VIVO**

TESIS

**Oleh:
FARAH FAUZIA MAULAHIBATI
NIM. 210602210004**

**diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Magister Sains (M.Si)**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2023

**ANALISIS POTENSI NANOPARTIKEL *Allium sativum*, *Curcuma mangga*,
DAN *Acorus calamus* SEBAGAI ANTIINFLAMASI SECARA IN-SILICO
DAN IN-VIVO**

TESIS

**Oleh:
FARAH FAUZIA MAULAHIBATI
NIM. 210602210004**

**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal 23 Mei 2023**

Pembimbing I



**Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001**

Pembimbing II



**Dr. Kiptiyah, M.Si
NIP. 19731005 200212 2 003**



**Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Biologi**
**Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001**

**ANALISIS POTENSI NANOPARTIKEL *Allium sativum*, *Curcuma mangga*,
DAN *Acorus calamus* SEBAGAI ANTIINFLAMASI SECARA IN-SILICO
DAN IN-VIVO**

TESIS

**Oleh:
FARAH FAUZIA MAULAHIBATI
NIM. 210602210004**

**telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Tesis dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Sains (M.Si)
tanggal: 06 Juni 2023**

Penguji Utama	Prof. Dr. apt. Roihatul M, S.Farm, M.Kes NIP. 198002032009122003	
Ketua Penguji	Dr. Zainabur Rahmah, M.Si NIDT. 19810207201701012122	
Sekretaris Penguji	Prof. Dr. drh. Bayyinatul M, M.Si NIP. 19710919 200003 2 001	
Anggota Penguji	Dr. Kiptiyah, M.Si NIP. 19731005 200212 2 003	

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi Magister Biologi**



**Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001**

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Berikut halaman persembahan kami sampaikan kepada seluruh yang tersebut atas segala do’a dan dukungannya sebagai ungkapan rasa bahagia ini”

Karya hebat yang penuh perjuangan ini, saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala kuasanya membuat saya kuat dan mampu menjalani perjalanan indah ini serta Rasulullah SAW yang selalu menjadi teladan yang sempurna untuk umat-umatnya.
2. Ayah Ahsanul Mubtadiin, S.Ag dan Ibu Siti Arofah, atas segala bentuk pendidikan, do’a, serta dukungan moral dan materiil yang telah diberikan selama ini, semoga kebahagiaan selalu tercurahkan kepada beliau berdua.
3. Adik M. Darwis Ramdhani dan M. Ilzam Mabur Kafabih selaku teman hidup dalam ikatan keluarga yang selalu memberikan do’a, semangat, serta dukungannya.
4. Ibu Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Ibu Dr. Kiptiyah, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah sabar memberikan arahan, bimbingan, dan dukungannya sampai tahap ini. Semoga keberkahan selalu tercurahkan kepada beliau.
5. Bapak Dr. Feri Eko Hermanto, M.Si yang telah memberi pelatihan *molecular docking* sehingga saya bisa menyelesaikan penelitian ini dengan baik. Semoga beliau senantiasa diberikan kesehatan dan keberkahan dalam hidupnya.
6. Kepada seluruh dosen Magister Biologi yang telah sabar mengajarkan saya berbagai macam disiplin keilmuan. Semoga beliau semua senantiasa mendapatkan kesehatan dan keberkahan dalam hidupnya.
7. Teman-teman FastTrack dan Magister Biologi angkatan 2021 yang telah menemani perjalanan indah 2 tahun ini. Perjalanan belum berakhir, tetap semangat dan sukses selalu ya.
8. Seluruh teman-teman dan pihak-pihak yang belum sempat tertulis dalam lembaran ini.

Terima Kasih

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Farah Fauzia Maulahibati
NIM : 210602210004
Program Studi : Magister Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Analisis Potensi Nanopartikel *Allium Sativum*, *Curcuma Mangga*, Dan *Acorus Calamus* Sebagai Antiinflamasi Secara In-Silico Dan In-Vivo

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 Mei 2023

Yang membuat pernyataan,



Farah Fauzia Maulahibati

NIM. 210602210004

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Analisis Potensi Nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, Dan *Acorus calamus* Sebagai Antiinflamasi Secara In-Silico Dan In-Vivo

Farah Fauzia Maulahibati, Bayyinatul Muchtaromah, Kiptiyah

Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Nanopartikel Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* mengandung beberapa senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi antiinflamasi secara *in-silico* dan *in-vivo* dari nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*. Analisis antiinflamasi secara *in-silico* dilakukan dengan skrining aktivitas antiinflamasi, analisis sifat mirip obat dan ADME, serta *molecular docking* terhadap protein NFkB dan COX-2. Aktivitas antiinflamasi secara *in-vivo* dilakukan dengan induksi cisplatin pada mencit dengan parameter kadar sitokin berupa CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , dan CD4⁺IL-10 dalam limpa mencit. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 6 ulangan, yaitu perlakuan yang diberi cisplatin + nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan dosis 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB, perlakuan yang diberi cisplatin + jamu subur kandungan dengan dosis 75 mg/kgBB, kelompok kontrol negative (aquadest) serta kelompok kontrol positif (cispatin + nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dosis 0 mg/kgBB). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* mengandung 123 senyawa bioaktif dengan 72 senyawa memiliki aktivitas tinggi sebagai antiinflamasi berdasarkan skrining dari PASS Online dan sebanyak 41 senyawa memenuhi aturan *lipinski rule of five* yang dilanjutkan dengan prediksi ADMET serta *molecular docking*. Senyawa yang berpotensi sebagai antiinflamasi dilihat dari nilai energi bebas dari *molecular docking* terhadap protein NFkB adalah Lupiwighteone dengan nilai -9.3 kkal/mol dan terhadap protein COX-2 adalah Apigenin, Fisetin, dan Catechin dengan nilai -9.8 kkal/mol. Nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dosis 25 mg/kgBB memiliki aktivitas antiinflamasi dengan nilai jumlah relative sel T CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , dan CD4⁺IL-10 secara berturut-turut 0.40%, 1.09%, dan 1.11% dan pada dosis 50 mg/kgBB memiliki nilai 0.06%, 0.41%, dan 1.15%.

Kata Kunci : Nanopartikel, *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, *Acorus calamus*, Cisplatin, Sitokin, *Molecular docking*

Potential Analysis of *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, and *Acorus calamus* nanoparticles as in-silico and in-vivo anti-inflammatory

Farah Fauzia Maulahibati, Bayyinatul Muchtaromah, Kiptiyah

Biology Masters Study Program, Faculty of Science and Technology,
State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Nanoparticles extracts of *A. sativum*, *C. mangga*, and *A. calamus* contain several active compounds that have potential as anti-inflammatories. This study aims to analyze the in-silico and in-vivo anti-inflammatory potential of nanoparticle extracts of *A. sativum*, *C. mangga*, and *A. calamus*. In-silico anti-inflammatory analysis was performed by screening for anti-inflammatory activity, analysis of druglikeness properties and ADME, as well as molecular docking of NFkB and COX-2 proteins. In-vivo anti-inflammatory activity was carried out by inducing cisplatin in mice with parameters of cytokine levels in the form of CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , and CD4⁺IL-10 in the spleen of mice. This study used a completely randomized design (CRD) with 5 treatments and 6 replications, namely the treatment given cisplatin + nanoparticle extracts of *A. sativum*, *C. mangga*, and *A. calamus* at a dose of 25 mg/kg and 50 mg/kg, the treatment was given cisplatin + herbal fertility at a dose of 75 mg/kg, the negative control group (aquadest) and the positive control group (cisplatin + *A. sativum*, *C. mangga*, and *A. calamus* extract nanoparticles at a dose of 0 mg/kgBB). The results of this study indicated that the nanoparticles of *A. sativum*, *C. mangga*, and *A. calamus* contain 123 bioactive compounds with 72 compounds having high activity as anti-inflammatories based on screening from PASS Online and as many as 41 compounds comply with the lipinski rule of five followed by ADMET predictions and molecular docking. The compounds had potential as anti-inflammatories seen from the free energy value of molecular docking for NFkB protein are Lupiwighteone with a value of -9.3 kcal/mol and for COX-2 protein are Apigenin, Fisetin, and Catechin with a value of -9.8 kcal/mol. Nanoparticles extracts of *A. sativum*, *C. mangga*, and *A. calamus* at a dose of 25 mg/kg have anti-inflammatory activity with relative numbers of CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , and CD4⁺IL-10 T cells respectively 0.40%, 1.09%, and 1.11% and at a dose of 50 mg/kg has a value of 0.06%, 0.41%, dan 1.15%.

Keywords : Nanoparticles, *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, *Acorus calamus*, Cisplatin, Cytokines, *Molecular docking*

التحليل المحتمل للجسيمات النانوية من *Allium sativum* و *Curcuma mangga* و *Acorus calamus* كمضادات للالتهابات في السيليكو وداخل الجسم

فرح فوزية مولاهباتي، بيئة المحترمة، كبتية

بقسم دراسة ماجستير الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ،
الجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج

نبذة مختصرة

تحتوي مستخلصات الجسيمات النانوية من *A. sativum* ، و *C. mangga* ، و *A. calamus* على العديد من المركبات النشطة التي لها القدرة على العمل كمضادات للالتهابات. تهدف هذه الدراسة إلى تحليل الإمكانات المضادة للالتهابات داخل السيليكو وداخل الجسم الحي لمستخلصات الجسيمات النانوية من *A. sativum* و *C. mangga* و *A. calamus*. تم إجراء التحليل المضاد للالتهابات في السيليكو عن طريق فحص النشاط المضاد للالتهابات ، وتحليل الخصائص المشابهة للعقار و ADME ، بالإضافة إلى الالتحام الجزيئي لبروتينات NFkB و COX-2 . تم إجراء النشاط المضاد للالتهاب في الجسم الحي عن طريق تحفيز السيسبلاتين في الفئران باستخدام معلمات مستويات السيتوكين في شكل $CD4^{+}TNF-\alpha$ ، $CD4^{+}IFN-\gamma$ و $CD4^{+}IL-10$ في طحال الفئران. استخدمت هذه الدراسة تصميمًا عشوائيًا بالكامل (CRD) مع 5 علاجات و 6 مكررات ، وهي العلاج المعطى باستخدام مستخلصات سيسبلاتين + أساتيفوم ، جسيمات من *A. sativum* و *C. mangga* و *A. calamus* بجرعة 25 مجم / كجم و 50 مجم / كجم ، تم إعطاء العلاج سيسبلاتين + خصوبة عشبية بجرعة 75 مجم / كجم ، مجموعة التحكم السلبية (أكوادست) ومجموعة التحكم الإيجابية (سيسبلاتين + أساتيفوم ، جسيمات مستخلص المانجو النانوية *A. sativum* و *C. mangga* و *A. calamus* بجرعة 0 مجم / كجم تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن الجسيمات النانوية لـ *A. sativum* و *C. mangga* و *A. calamus* تحتوي على 123 مركبًا نشطًا بيولوجيًا مع 72 مركبًا لها نشاط عالٍ كمضادات للالتهابات بناءً على الفحص من PASS Online وما يصل إلى 41 مركبًا تتوافق مع قاعدة Lipinski المكونة من خمسة متبوعة بتنبؤات ADMET والالتحام الجزيئي. أن المركبات التي لها إمكانات كمضادات للالتهابات تثرى من قيمة الطاقة المجانية للالتحام الجزيئي لبروتين NFkB هي Lupiwighteone بقيمة -9.3 كيلو كالوري / مول وبالنسبة لبروتين COX-2 هي Apigenin و Fisetin و Catechin بقيمة -9.8 كيلو كالوري / مول. مقتطفات الجسيمات النانوية من *A. sativum* و *C. mangga* و *A. calamus* بجرعة 25 مجم / كجم لها نشاط مضاد للالتهابات بأرقام نسبية من $CD4^{+}TNF-\alpha$ ، $CD4^{+}IFN-\gamma$ و $CD4^{+}IL-10$ الخلايا التائية على التوالي 0.40% و 1.09% و 1.11% و بجرعة 50 مجم / كجم لها قيمة 40.0% و 1.09% و 1.11%.

الكلمات الدالة : الجسيمات النانوية ، *Allium sativum* ، *Curcuma mangga* ، *Acorus calamus* ، سيسبلاتين ، السيتوكينات ، الالتحام الجزيئي

KATA PENGANTAR

Bismillahirrohmanirrohim, Segala puji bagi Allah SWT atas segala ridhoNya yang telah memberikan nikmat, rahmat, dan ridhoNya. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW karena berkat syafaat sholawatnya-lah penulis dapat menyelesaikan naskah tesis ini dengan baik. Penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak atas semua do'a dan dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah tesis ini, khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A., selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Ketua Program Studi Magister Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Kiptiyah, M.Si selaku Dosen Pembimbing Skripsi I dan II Program Studi Magister Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, S.Farm, M.Kes dan Dr. Zainabur Rahmah, M.Si, selaku Dosen Penguji Program Studi Magister Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd, selaku Dosen Wali Program Studi Magister Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Seluruh dosen, laboran, dan staff Program Studi Magister Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Naskah tesis ini telah ditulis dengan cermat dan sebaik-baiknya, namun apabila terdapat kesalahan dan kekurangan, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan untuk menjadikan naskah ini lebih baik lagi. Dengan demikian, penulis berharap semoga yang ditulis dalam tesis ini dapat menjadikan kemanfaatan dan keberkahan untuk semua pihak, baik pembaca maupun penulis. *Aamiin aamiin Ya Rabbal Alamiin.*

Malang, 15 Mei 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN SAMPUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
نبذة مختصرة	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan	8
1.4 Manfaat	8
1.5 Hipotesis	8
1.6 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Allium sativum</i>	10
2.2 <i>Curcuma mangga</i>	12
2.3 <i>Acorus calamus</i>	13
2.4 Nanopartikel.....	15
2.4.1 Nanopartikel Gelasi Ionik	18

2.5 Mekanisme Inflamasi.....	19
2.5.1 Mekanisme Jalur NF-kB	22
2.5.2 Mekanisme Jalur Enzim Siklooksigenase (COX).....	24
2.6 Pendekatan Bioinformatika.....	26
2.6.1 Analisis Sifat Mirip Obat Berdasarkan Aturan Lipinski	28
2.6.2 Prediksi ADME.....	29
2.6.3 Simulasi <i>Molecular Docking</i>	31
2.7 Cisplatin	33
2.8 Sitokin.....	36
2.8.1 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- α).....	39
2.8.2 Interferon Gamma (IFN- γ).....	40
2.9 Kerangka Konsep.....	42
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian.....	47
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	48
3.3 Alat dan Bahan.....	48
3.3.1 Alat.....	48
3.3.2 Bahan	49
3.4 Prosedur Penelitian <i>In Silico</i>	50
3.4.1 Analisis Sifat Mirip Obat dan Prediksi Farmakologi ADME.....	50
3.4.2 Preparasi Protein	50
3.4.3 Preparasi Ligand	51
3.4.4 Penambatan Ligand-Protein.....	51
3.4.5 Validasi Metode <i>Molecular Docking</i>	52
3.4.6 Analisis dan Visualisasi	52
3.4.7 Analisis Data.....	52
3.5 Prosedur Penelitian <i>In Vivo</i>	53
3.5.1 Persiapan Hewan Coba dan Pemberian Cisplatin.....	53
3.5.2 Pengecekan Siklus Estrus dengan Metode Apus Vagina.....	53
3.5.3 Preparasi Sampel Tanaman dan Ekstraksi dengan Metode Maserasi ...	54

3.5.4 Pembuatan Nanopartikel Kombinasi Ekstrak <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma mangga</i> , dan <i>Acorus calamus</i>	54
3.5.5 Pemberian Nanopartikel Ekstrak <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma mangga</i> , dan <i>Acorus calamus</i>	54
3.5.6 Pembedahan Mencit dan Pengambilan Limpa.....	55
3.5.7 Pengukuran Kadar Sitokin dengan <i>Flowcitometry</i>	56
3.5.8 Analisis Data.....	56
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Studi In-Silico	57
4.1.1 Skrining Aktivitas Antiinflamasi	57
4.1.2 Analisis Sifat Mirip Obat (<i>Druglikeness</i>)	61
4.1.3 Analisis ADME.....	65
4.1.4 Studi <i>Molecular Docking</i>	73
4.1.4.1 Penambatan Molekuler Senyawa Uji dengan Reseptor NFkB.....	77
4.1.4.2 Penambatan Molekuler Senyawa Uji dengan Reseptor COX-2.....	83
4.2 Studi In-Vivo.....	94
4.2.1 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α	94
4.2.2 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN- γ	99
4.2.3 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IL-10	103
4.3 Integrasi Al-Qur'an dan Hadits Terkait Hasil Penelitian.....	106
 BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	111
5.2 Saran.....	111
 DAFTAR PUSTAKA	113
DAFTAR LAMPIRAN	121

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Prediksi Aktivitas Antiinflamasi	57
Tabel 4.2 Hasil Uji Druglikeness Menurut Aturan <i>Lipinski Rule of Five</i>	62
Tabel 4.3 Hasil Analisis Absorpsi dan Distribusi	65
Tabel 4.4 Hasil Analisis Metabolisme	68
Tabel 4.5 Hasil Analisis Ekskresi dan Toksisitas	70
Tabel 4.6 Identitas Makromolekul yang Digunakan.....	73
Tabel 4.7 Hasil Validasi Metode.....	76
Tabel 4.8 Hasil Analisis <i>Molecular Docking</i> Senyawa Uji dengan Reseptor NFkB	77
Tabel 4.9 Hasil Analisis <i>Molecular Docking</i> Senyawa Uji dengan Reseptor COX-2	83

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Allium sativum</i>	10
Gambar 2.2 <i>Curcuma mangga</i>	13
Gambar 2.3 <i>Acorus calamus</i>	14
Gambar 2.4 Perbedaan Pengiriman Menggunakan Metode Konvensional dan Nanopartikel.....	17
Gambar 2.5 Ilustrasi Matriks Nanopartikel Gelasi Ionik	19
Gambar 2.6 Gen Target NFkB yang Terlibat dalam Perkembangan Inflamasi..	24
Gambar 2.7 Jalur Mekanisme Inflamasi Melalui Enzim Siklooksigenase dan Lipooksigenase	26
Gambar 2.8 Mekanisme Kerja Cisplatin	35
Gambar 4.1 Makromolekul NFkB dan Native Ligandnya.....	74
Gambar 4.2 Makromolekul COX-2 dan Native Ligandnya.....	75
Gambar 4.3 Senyawa Obat Ibuprofen	75
Gambar 4.4 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Native Ligand dengan Reseptor NFkB Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	79
Gambar 4.5 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Ibuprofen dengan Reseptor NFkB Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	80
Gambar 4.6 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Senyawa Lupiwighteone dengan Reseptor NFkB Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan).....	81
Gambar 4.7 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Native Ligand dengan Reseptor COX-2 Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	85
Gambar 4.8 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Ibuprofen dengan Reseptor COX-2 Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	87
Gambar 4.9 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Senyawa Apigenin dengan Reseptor COX-2 Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	88
Gambar 4.10 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Senyawa Fisetin dengan Reseptor COX-2 Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	90
Gambar 4.11 Interaksi Ikatan dan Residu Asam Amino Senyawa Catechin dengan Reseptor COX-2 Bentuk 2D (Kiri) dan 3D (Kanan)	92

Gambar 4.12 Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α Pada Masing-Masing Perlakuan	95
Gambar 4.13 Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α	96
Gambar 4.14 Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN- γ Pada Masing-Masing Perlakuan	100
Gambar 4.15 Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN- γ	101
Gambar 4.16 Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IL-10 Pada Masing-Masing Perlakuan	104
Gambar 4.17 Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IL-10.....	105

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Alur Penelitian.....	121
Lampiran 2 : Data Hasil LCMS <i>A. sativum</i> , <i>C. mangga</i> , dan <i>A. calamus</i>	122
Lampiran 3 : Data Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α Pada Masing-Masing Perlakuan	124
Lampiran 4 : Data Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN- γ Pada Masing-Masing Perlakuan	124
Lampiran 5 : Data Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IL-10 Pada Masing-Masing Perlakuan	125
Lampiran 6 : Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α	126
Lampiran 7 : Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN- γ	128
Lampiran 8 : Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IL-10.....	130
Lampiran 9 : Perhitungan Dosis	132

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ketidaksuburan atau infertil merupakan kondisi pasangan yang tidak mampu hamil setelah melakukan hubungan seksual tanpa alat kontrasepsi selama 12 bulan atau lebih. Banyak faktor yang dapat menyebabkan kondisi infertil, termasuk perubahan dalam siklus menstruasi dan ovulasi, masalah hormon, stres oksidatif, dan deformitas organ reproduksi (Muchtaromah *et al*, 2019). Penginduksian cisplatin dapat menyebabkan kondisi infertil pada hewan coba mencit (*Mus musculus*). Cisplatin merupakan agen perantara gonadotoksik yang memiliki efek toksik pada folikel primordial berupa penghambatan regenerasi serta kerusakan dan disfungsi ovarium. Kerusakan dan disfungsi ovarium menyebabkan meningkatnya produksi radikal bebas dalam tubuh melalui induksi glukosa-6-fosfat pada aktivitas dehidrogenase dan heksokinase (Muchtaromah *et al*, 2020).

Radikal bebas yang terbentuk menyebabkan peningkatan kadar serum faktor transkripsi NFκB. Jalur pensinyalan faktor nuklir *kappa-light-chain-enhancer* dari jalur sel B (NFκB) mendorong makrofag dan neutrofil untuk merespon inflamasi dan meningkatkan ekspresi sitokin dan enzim. Sitokin merupakan protein mirip hormon yang bertindak sebagai pemberi sinyal untuk mengatur respon imun dan respon terhadap infeksi, peradangan, dan trauma. Terdapat dua macam sifat sitokin, yaitu antiinflamasi dan proinflamasi. Sitokin antiinflamasi berfungsi untuk menyembuhkan luka setelah cedera, infeksi, atau penghancuran benda asing. Sitokin proinflamasi bertugas memulai respon inflamasi dengan merekrut limfosit untuk melawan penyakit. Contoh sitokin antiinflamasi adalah interleukin

(IL-10, IL-4) dan TGF- di hippocampus, cortex, hypothalamus, dan limpa serta proinflamasi antara lain tumour-necrosis factor (TNF), interferon (IFN), dan interleukin (IL-1 β - IL-6, IL-18). Pelepasan sitokin proinflamasi ke dalam darah menjadi sinyal penanda adanya inflamasi (Nasser, 2020).

Enzim yang teraktivasi oleh aktivitas faktor transkripsi NF κ B adalah siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX). Fosfolipid yang dibebaskan oleh membran sel yang rusak dikonversi menjadi asam arakidonat (AA) oleh enzim fosfolipase A2 (PLA2). Kelebihan AA dikonversi oleh jalur siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX) menjadi zat inflamasi yang kuat seperti prostaglandin (PG), leukotrien (LT), dan tromboksan A2 (TXA). Siklooksigenase (COX) dan 5-lipooksigenase (5-LOX) merupakan enzim kunci yang terlibat dalam pembentukan mediator proinflamasi (Ifora dkk, 2021).

Inflamasi yang berlebih dapat menimbulkan beberapa penyakit, sehingga perlu diatasi. Rasulullah SAW bersabda bahwa Allah SWT menciptakan penyakit sekaligus dengan obat penawarnya. Hal ini dituangkan dalam hadist riwayat Turmuzi, Abu Daud dan Ibnu Majah sebagai berikut:

عَنْ أُسَامَةَ بْنِ شَرِيكٍ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ، قَالَ: ((قَالَتِ الْأَعْرَابُ: يَا رَسُولَ اللَّهِ، أَلَا نَتَدَاوَى؟ قَالَ: نَعَمْ، يَا عِبَادَ اللَّهِ تَدَاوَوْا؛ فَإِنَّ اللَّهَ لَمْ يَضَعْ دَاءً إِلَّا وَضَعَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “*Dari Usamah bin Syuraik ra, ia berkata: Orang-orang Arab Badui berkata: Wahai Rasulullah, bolehkah kami berobat?, Rasul menjawab: Ya, wahai hamba Allah berobatlah. Sesungguhnya Allah tidak menciptakan penyakit kecuali menciptakan penawarnya (HR. Turmuzi, Abu Daud, dan Ibnu Majah)*

Hadits di atas menjelaskan bahwa manusia diperbolehkan untuk melakukan pengobatan demi kesehatannya, tetapi mereka tidak dibolehkan berobat menggunakan sesuatu yang haram. Haram yang dimaksud dapat berupa

keharaman dari sisi kandungan obat maupun dari metode berobatnya. Melakukan pengobatan untuk menyembuhkan penyakit bukan merupakan sikap melawan takdir dan tawakal pada Allah SWT, melainkan seperti halnya makan untuk menghilangkan lapar atau mengenakan pakaian agar tidak kedinginan. Hal-hal tersebut termasuk dalam proses dan usaha sebab-akibat yang dapat mendatangkan pahala dari Allah SWT (Razali, 2021).

Inflamasi yang terjadi dalam tubuh dapat diatasi dengan penggunaan *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*. Kombinasi ketiga tanaman tersebut memiliki aktivitas immunomodulator, antioksidan, dan antiinflamasi yang dapat memperbaiki sistem imun tubuh. Hal ini sesuai dengan yang tersirat dalam QS. Asy-Syu'ara [26]: 7 tentang tumbuhan yang bermanfaat yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapa banyakkah Kami tumbuhkan di bumi ini berbagai macam tumbuhan-tumbuhan yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara [26]: 7)

Menurut tafsir Al-Qurtubi, terdapat kalimat penting dalam ayat di atas, yakni memperhatikan tumbuh-tumbuhan yang baik serta mulia. Tanaman yang baik dimaksudkan dengan tanaman yang mengandung banyak manfaat dan dapat dimanfaatkan (Al-Qurtubi, 2008). Berdasarkan penafsiran M. Quraish Shihab dalam tafsir al-Misbah, Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan dan baik diartikan dengan tumbuhan yang tumbuh dengan subur dan memberi banyak manfaat (Shihab, 2002). Salah satu manfaatnya adalah digunakan untuk antiinflamasi.

Pada penelitian *in vitro* sebelumnya, ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan perbandingan 36% : 36% : 28% dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* serta menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi (Mughtaromah *et al*, 2017). Pada penelitian secara *in vivo*, menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dapat meningkatkan fertilitas mencit betina dapat meningkatkan kadar estrogen dan progesteron pada dosis optimal 50 mg/kgBB (Mughtaromah *et al*, 2020). Pada penelitian sebelumnya, hasil LCMS kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* mengandung 119 senyawa aktif yang dapat dianalisis potensinya sebagai antiinflamasi secara *in silico* (Mughtaromah *et al*, 2019).

Analisis tersebut dilakukan melalui evaluasi kemiripan obat, prediksi ADME, dan *molecular docking* (Daina *et al*, 2017). Evaluasi sifat mirip obat secara umum dilakukan berdasarkan aturan Lipinski (*rule of five*) untuk melihat apakah obat tersebut dapat digunakan secara oral atau tidak. Aturan Lipinski merupakan aturan yang dibuat untuk menentukan molekul atau senyawa yang dilihat dari sifat permeabilitas dan absorpsinya. Senyawa obat diharapkan mampu mencapai organ target agar senyawa aktif di dalamnya dapat berinteraksi dengan baik dalam tubuh (Maftucha *dkk*, 2022).

Prediksi ADME dapat memberikan informasi mengenai karakteristik farmakokinetik dan farmakodinamik dari sebuah molekul obat. Prediksi ADME memperlihatkan berbagai profil absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi yang meliputi absorpsi pada usus manusia (*human intestinal absorption*, HIA), bioavailabilitas oral manusia (*human oral bioavailability*, HOB), distribusi sawar darah otak (*blood brain barrier*, BBB), ikatan protein plasma (*plasma protein*

binding, PPB), dan parameter inhibisi serta substrat P-glikoprotein (Pgp) (Nusantoro & Fadlan, 2020).

Pengujian potensi senyawa aktif yang memenuhi evaluasi sifat mirip obat dan prediksi ADME sebagai antiinflamasi didasarkan pada interaksinya dengan protein NF-kB dan enzim COX-2 menggunakan *molecular docking* untuk mengetahui ikatan senyawa uji dan interaksi yang dapat terbentuk antara keduanya (Candra & I Made, 2021). *Molecular docking* membantu mempelajari interaksi antara senyawa obat dengan protein melalui pengidentifikasian situs aktif yang cocok pada protein. *Molecular docking* menjadi dasar untuk penemuan obat secara simulasi komputasi (Setiawan & Mohammad, 2017).

Senyawa-senyawa antiinflamasi tersebut berasal dari golongan flavonoid, terpenoid, saponin, dan steroid yang terkandung dalam kombinasi tiga tanaman tersebut. Senyawa flavonoid diketahui memiliki efek potensial sebagai antiinflamasi. Senyawa flavonoid terbukti dapat menghambat produksi TNF- α dan *nitric oxide* oleh lipopolisakarida dari makrofag yang teraktivasi, supresi TNF- α diduga melalui penghambatan aktivitas NFkB (Muchtarmah dkk, 2019), menurunkan aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2), lipooksigenase, dan enzim nitrat oksida sintase (iNOS (Nasser, 2020).

Senyawa golongan terpenoid memiliki aktivitas antiinflamasi melalui peningkatan fungsi kognitif dan plastisitas sinaptik dengan menekan aktivitas krogial dan menurunkan regulasi inflamasi yang dimediasi mikroglia sehingga dapat menurunkan kadar IL-1 β dan TNF- α , menghambat aktivitas NFkB, dan menurunkan fosforilasi kinase yang diatur sinyal ekstraseluler (ERK) (Balakrishnan *et al*, 2022). Senyawa saponin memiliki aktivitas antiinflamasi

dengan menghambat pembentukan eksudat dan menghambat permeabilitas vascular (Astika *et al*, 2022). Senyawa steroid memiliki aktivitas inflamasi melalui penghambatan enzim fosfolipase sehingga asam arachidonat dan prostaglandin tidak terbentuk dengan cara merintanginya bebasnya enzim, menstabilkan membrane lisosom, menghambat pelepasan mediator-mediator inflamasi, dan menghambat migrasi serta infiltrasi leukosit (Astika *et al*, 2022).

Akan tetapi penggunaan ekstrak tanaman herbal memiliki kelemahan, yaitu membutuhkan dosis yang besar untuk mengonsumsinya. Hal ini dikarenakan ekstrak tumbuhan memiliki kelarutan yang rendah dalam saluran cerna, sehingga tersimpan rendah dalam plasma darah (Zhang *et al*, 2013). Perlu digunakan suatu metode untuk memaksimalkan penggunaan *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* sebagai obat. Penggunaan nanopartikel banyak digunakan dalam proses enkapsulasi obat untuk meningkatkan sifat mukoadhesif dari obat sehingga bioavailabilitasnya meningkat dan untuk melindungi senyawa aktif yang terkandung di dalamnya (Marvita dkk, 2021). Pengaplikasian metode nanopartikel dalam enkapsulasi obat dapat dilakukan menggunakan biopolimer, seperti kitosan. Kitosan memiliki keunggulan berupa dapat membuka *epithelial tight junction* pada usus sehingga dapat meningkatkan penyerapan pada obat oral (Wang *et al*, 2017).

Analisis potensi *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* sebagai antiinflamasi juga dapat diperkuat dengan uji *in vivo*. Pengujian *in vivo* dilakukan terhadap sitokin pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi cisplatin. Kadar sitokin dianalisis menggunakan *flowcytometry*. *Flowcytometry* merupakan teknik yang dapat digunakan untuk membedakan sel berdasarkan penyebaran sinar yang

ditangkap oleh detektor yang dapat mengidentifikasi berbagai antigen permukaan sel yang dianalisis. Metode ini memiliki keunggulan berupa tingkat sensitivitas yang tinggi terhadap sel sehingga diperoleh hasil yang akurat. Selain itu, metode ini dinilai lebih efektif dan efisien karena waktu penyelesaiannya yang cepat dan dapat mengukur beberapa parameter secara bersamaan (Nadhira dkk, 2018)

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian tentang potensi nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* sebagai antiinflamasi secara in-silico dan in-vivo melalui analisis druglikeness, prediksi ADME, dan molecular docking serta profil sitokin mencit yang diinduksi cisplatin, meliputi kadar $CD4^+TNF-\alpha$, $CD4^+IFN-\gamma$, dan $CD4^+IL-10$ perlu dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini, adalah:

1. Bagaimana analisis in-silico senyawa aktif antiinflamasi nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* terhadap protein NF-kB dan enzim COX-2?
2. Bagaimana pengaruh nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* terhadap kadar $CD4^+TNF-\alpha$, $CD4^+IFN-\gamma$, dan $CD4^+IL-10$ mencit yang diinduksi cisplatin?

1.3 Tujuan

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini, adalah:

1. Untuk mengetahui analisis in-silico senyawa aktif antiinflamasi nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* terhadap protein NF- κ B dan enzim COX-2
2. Untuk mengetahui pengaruh nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* terhadap kadar CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , dan CD4⁺IL-10 mencit yang diinduksi cisplatin.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini, adalah:

1. Bagi peneliti adalah untuk mengetahui potensi *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* sebagai obat antiinflamasi dan pengaruh pemberiannya dalam bentuk nanopartikel terhadap kadar CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , dan CD4⁺IL-10 mencit infertil.
2. Untuk masyarakat adalah untuk menyampaikan informasi terkait potensi nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* dalam bentuk nanopartikel sebagai obat antiinflamasi.

1.5 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat pengaruh nanopartikel *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* terhadap kadar CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , dan CD4⁺IL-10 mencit yang diinduksi cisplatin serta dapat dikembangkan menjadi kandidat obat antiinflamasi.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. Penelitian ini menggunakan sampel umbi *A. sativum*, rimpang *C. mangga*, dan rimpang *A. calamus* yang didapatkan dari UPT. Materia Medika, Batu Malang.
2. Ekstrak yang digunakan merupakan ekstrak kombinasi dari serbuk sampel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*.
3. Hewan coba yang digunakan berupa mencit (*Mus musculus*) berjenis kelamin betina dengan galur Balb-C yang memiliki berat badan 20-25 gram dan berusia 2-3 bulan.
4. Pengecekan hewan coba infertil menggunakan pengecekan siklus estrus dengan metode apus vagina sampai hewan coba berada dalam fase diestrus.
5. Pendekatan bioinformatika melalui skrining aktivitas antiinflamasi, analisis sifat mirip obat (*druglikeness*), analisis ADMET, dan *molecular docking* terhadap protein NF-kB dan enzim COX-2.
6. Parameter yang digunakan adalah kadar sitokin dalam organ limpa hewan coba, berupa kadar CD4⁺ TNF- α , CD4⁺ IFN- γ , dan CD4⁺IL-10.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Allium sativum*

Klasifikasi bawang putih (*Allium sativum*) menurut ITIS (2021), adalah:

Kingdom : Plantae

Division : Tracheophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Asparagales

Family : Amarylidaceae

Genus : *Allium* L.

Species : *Allium sativum* L.



Gambar 2.1 *Allium sativum* (Hernawan & Ahmad, 2003)

A. sativum (Bawang putih) merupakan tanaman dari familia Liliaceae yang tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak dengan tinggi sekitar 30-75 cm. Umbi bawang putih berbentuk siung sebanyak 8-20 siung per umbi dan antar siungnya dipisahkan oleh kulit tipis. Setiap siung dalam umbi bersatu membentuk kesatuan yang rapat dan kuat. Bawang putih memiliki daun helaian yang bentuknya menyerupai pita dan panjangnya sekitar 30-60 cm dengan lebar 1-2,5 cm. Setiap tanaman bawang putih memiliki daun sebanyak 7-10 helai (Hernawan & Ahmad, 2003).

A. sativum memiliki kandungan senyawa aktif yang terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu thiosulfinat, organosulfur volatil, dan senyawa organosulfur larut air (Moutia *et al*, 2018):

- 1) Thiosulfinat, berupa allicin yang merupakan hasil konversi sulfoksida melalui reaksi enzimatis sistein tersubstitusi belerang sulfoksida ketika bawang putih mentah diproses. Senyawa ini tidak ditemukan dalam bawang putih utuh tetapi ditemukan pada saat bawang putih diekstraksi dengan larutan aqueous, γ -glutamyl-S-allyl-L-cysteines diubah melalui transformasi enzimatis dengan γ -glutamyltranspeptidase menjadi SAC.
- 2) Organosulfur volatile, berupa DAS, DADS, methylallyl disulfide, methylallyl trisulfide, diallyl trisulfide, 3-vinyl-4H-1,2-dithiin, 2-vinyl-4H-1,3 dithiin, dan (E,Z)-ajoene yang khas pada *A. sativum*. Diallyl trisulfide merupakan kandungan *A. sativum* yang paling banyak ditemukan dalam minyak bawang putih segar.
- 3) Senyawa organosulfur larut air, berupa S-allyl-L-cysteines dari γ -glutamyl-S-allyl-L-cysteines. Kandungan tersebut dapat ditemukan pada *A. sativum* yang berbentuk ekstrak alkohol dan aqueous.

Selain ketiga kelompok kandungan di atas, *A. sativum* juga memiliki senyawa bioaktif lain seperti prostaglandin, lektin, pectin, fruktan, adenosine, vitamin B1, B2, B6, C, dan E, asam nikotinat, biotin, glikolipid, fosfolipid, asam lemak, dan asam amino esensial selain saponin dan saponin steroid. Kandungan-kandungan tersebut memiliki beberapa aktivitas farmakologis seperti antijamur, antitrombotik, antitumor, dan hipokolesterolemia (Moutia *et al*, 2018). Banyak penelitian yang telah dilakukan tentang bawang putih terkait dengan obat-obatan,

seperti anti-oksidan, anti-kolesterol, anti-diabetes, anti-aterosklerosis, anti-hipertensi, anti-virus, anti-kanker, anti-mikrobia, anti-agregasi sel platelet, dan pemacu fibrinolisis (Hernawan & Ahmad, 2003).

2.2 *Curcuma mangga*

Klasifikasi temu mangga (*Curcuma mangga*) menurut ITIS (2021), adalah:

Kingdom : Plantae

Division : Tracheophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Zingiberales

Family : Zingiberaceae

Genus : *Curcuma* L.

Species : *Curcuma mangga* Val.

C. mangga (Temu mangga) termasuk tanaman golongan semak-semak dengan tinggi 1-2 m. Tanaman ini memiliki batang yang tertanam di tanah, memiliki rimpang hijau, memiliki daun tunggal menyirip berwarna hijau. Akar tanaman ini berupa serabut berwarna putih. Kulit rimpang memiliki warna putih kekuningan dengan daging rimpang berwarna kuning muda dan memiliki bau buah seperti buah mangga kweni. (Sari & Imam, 2016). *C. mangga* termasuk dalam suku Zingiberaceae yang berasal dari Indo-Malaysia dan didistribusikan luas di beberapa negara, seperti Cina, Taiwan, Thailand, dan Australia. *C. mangga* memiliki bau yang khas seperti buah mangga. Tanaman ini banyak digunakan masyarakat sebagai obat pada beberapa penyakit, seperti kanker, demam, dan gangguan perut (Yuandani *et al*, 2020).



Gambar 2.2 *Curcuma mangga* (Yuandani et al, 2020)

C. mangga memiliki kandungan utama berupa kurkuminoid, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri. Kurkumin dan flavonoid banyak digunakan dalam pengobatan kanker secara tradisional maupun medis (Sari & Imam, 2016). *C. mangga* memiliki aktivitas sebagai anti-kanker, anti-inflamasi, dan antijamur.. Pada penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa *C.mangga* memiliki aktivitas imunomodulator sebagai agen imunomodulasi yang dapat meningkatkan kemampuan fagositosis pada mencit. Selain itu juga dapat merangsang respon kekebalan tubuh terhadap *Staphylococcus aureus* baik pada tikus normal maupun tikus yang diinduksi doxorubicin (Yuandani et al, 2020). *C. mangga* juga mengandung beberapa senyawa organik yang digunakan pada obat-obatan penting, seperti sitosterol, kurkumin, demethoxycurcumin, dan bisdemethoxycurcumin yang dapat mengevaluasi aktivitas imunomodulator. Ekstrak dan senyawa *C. mangga* yang diisolasi telah diteliti aktivitas farmakologisnya, seperti anti-inflamasi, antioksidan, antikanker, antijamur, analgesic, dan penghambatan oksidanitrat (Yuandani & Edi, 2017).

2.3 *Acorus calamus*

Klasifikasi bawang putih (*Acorus calamus*) menurut ITIS (2021), adalah:

Kingdom : Plantae

Division : Tracheophyta

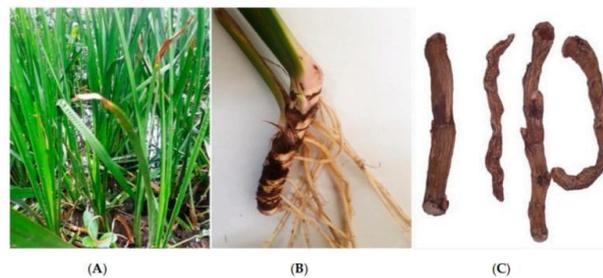
Class : Magnoliopsida

Order : Acorales

Family : Acoraceae

Genus : *Acorus* L.

Species : *Acorus calamus* L.



Gambar 2.3 *Acorus calamus*, (a) Habitat asli, (b) Rimpang, (c) Rimpang kering (Sharma *et al*, 2020)

A. calamus (Jeringau) merupakan tumbuhan dalam famili Acoraceae yang umum digunakan pada pengobatan tradisional Cina dan India sebagai bahan obat-obatan. Rimpang *A. calamus* berwarna coklat dengan bentuk silindris yang sedikit melengkung. Daun tanaman ini berwarna hijau cerah dengan bentuk seperti pedang yang lebih tebal di tengah, dan melengkung di pinggir. Pada pengobatan tradisional Cina dan India, tanaman *A. calamus* ini digunakan untuk analgesik, antipiretik, tonik, dan anti-obesitas. Tanaman ini dapat digunakan untuk mengobati penyakit neurologis, gastrointestinal, pernapasan, kulit, dan beberapa gangguan kesehatan lainnya (Sharma *et al*, 2020). *A. calamus* juga berguna sebagai obat cacing, obat maag, penyegar, pendingin, pencahar, leukoderma, dan keluhan rahim. *A. calamus* memiliki aktivitas anti-inflamasi, hepatoprotektif, antibakteri, antiulkus, dan antioksidan (Ravichandiran & Patil, 2015).

A. calamus mengandung senyawa aktif berupa saponin, flavonoid, polifenol, minyak atsiri, tanin, dan glikosida. Banyak penelitian telah dilakukan terkait *A. calamus* yang digunakan sebagai obat antihelminik, aromatik, obat penenang karena memiliki sifat stimulan, asma bronkitis, tumor di perut, kolik, demam, penyakit mental, dan pengobatan epilepsi (Widyastuti dkk, 2019). Rimpang dan daun *A. calamus* mengandung senyawa utama berupa β -asarone dan linalool yang dapat bertindak sebagai bakterisida dan antihelminik (Nikkhoo *et al*, 2021).

2.4 Nanopartikel

Nanopartikel merupakan suatu senyawa berukuran 1-100 nanometer yang membentuk satu kesatuan lengkap menjadi sebuah partikel. Adanya partikel yang berukuran kecil, secara implisit dikenal dengan dzarrah dan terdapat dalam Q.S Saba' [34]: 3:

وَقَالَ الَّذِينَ كَفَرُوا لَا تَأْتِينَا السَّاعَةُ ۗ قُلْ بَلَىٰ وَرَبِّي لَتَأْتِيَنَّكُمْ عِلْمُ الْغَيْبِ ۗ لَا يُعْزِبُ عَنْهُ
مِثْقَالُ ذَرَّةٍ فِي السَّمَوَاتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَلَا أَصْغَرُ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرُ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُّبِينٍ



Artinya : “Dan orang-orang yang kafir berkata: “Hari berbangkit itu tidak akan datang kepada kami”. Katakanlah: “Pasti datang, demi Tuhanki yang mengetahui yang ghaib, Sesungguhnya kiamat itu pasti akan datang kepadamu. Tidak ada tersembunyi daripada-Nya sebesar Zarahpun yang ada di langit dan yang ada di bumi dan tidak ada (pula) yang lebih kecil dari itu dan yang lebih besar, melainkan tersebut dalam kitab yang nyata (Lauhul Mahfuzh)” (QS. Saba' [34]: 3)

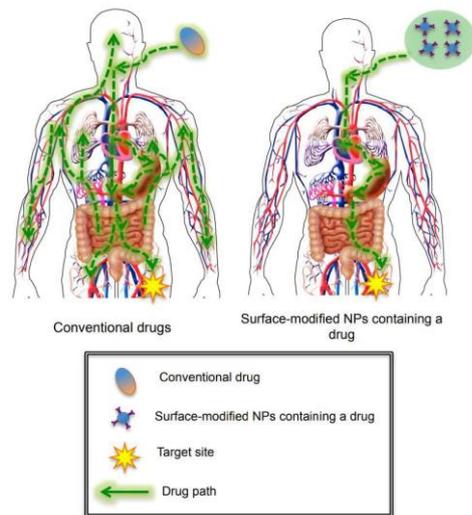
Berdasarkan tafsir al-Misbah, M. Quraish Shihab menerjemahkan lafal dzarrah berupa debu, kepala semut, dan semut yang sangat kecil yang terlihat

hanya pada celah matahari. Dzarrah dalam Al-Qur'an merujuk pada objek yang berukuran sangat kecil. Sedangkan pada pengetahuan umum, dzarrah dikaitkan dengan atom yang juga berukuran sangat kecil (Shihab, 2002). Seiring dengan perkembangan teknologi yang pesat, telah ditemukan sebuah metode penghantaran obat menggunakan partikel berukuran kecil yang disebut dengan nanopartikel.

Nanopartikel diambil dari bahasa Yunani, yaitu "*nanos*" yang berarti "kurcaci". Nanopartikel merupakan partikel kecil yang dapat menembus hambatan fisiologis dalam tubuh dan beredar dalam sistem peredaran darah. Nanopartikel berdimensi lebih kecil dari 1 μm dan bersifat unik daripada partikel besar. Sifat unik tersebut berupa bentuk nanopartikel yang sampai pada tingkatan atom (Buzea *et al*, 2007). Nanopartikel terbagi dalam dua macam ukuran, yaitu partikel halus dan partikel ultra halus. Salah satu pengaplikasian nanopartikel dalam dunia medis adalah penggunaan nanopartikel sebagai agen pengiriman obat-obatan, panas, cahaya atau elemen lainnya pada sel tertentu dalam tubuh secara spesifik (Kumari, 2018).

Nanopartikel dibentuk dengan ukuran yang sangat kecil dengan maksud untuk dapat langsung menuju ke sel-sel penyakit dan mengobati sel-sel tersebut secara langsung. Teknik pengobatan menggunakan nanopartikel ini dapat mengurangi kerusakan sel-sel sehat dalam tubuh dan juga dapat mendeteksi suatu penyakit secara dini. Nanopartikel dibuat dengan tujuan untuk mengatasi kesulitan kelarutan zat aktif, memperbaiki bioviabilitas senyawa yang buruk, dan memodifikasi sistem penghantaran obat menuju ke daerah yang spesifik secara langsung. Selain itu, nanopartikel juga berperan dalam peningkatan stabilitas zat

aktif dari kerusakan lingkungan, perbaikan absorpsi senyawa makromolekul, dan pengurangan efek iritasi dari zat aktif di saluran pencernaan (Abdassah, 2015).



Gambar 2.4 Perbedaan Pengiriman Menggunakan Metode Konvensional dan Nanopartikel (Cartaxo, 2018)

Keuntungan yang didapat dari penggunaan nanopartikel, diantaranya adalah memiliki bioavailabilitas yang lebih besar, dosis obat yang proporsional, ukuran bentuk yang kecil, meningkatkan luas permukaan sehingga zat aktif lebih cepat menyebar, dan tingkat toksisitas yang rendah (Pal *et al*, 2011). Beberapa keuntungan tersebut menyebabkan nanopartikel dapat digunakan sebagai agen pengiriman obat dan diaplikasikan pada beberapa bidang, seperti bioremediasi, bioelektrik, teknik mesin, kosmetik, dan sebagainya (Buzea *et al*, 2007).

Nanopartikel juga memiliki kemampuan untuk menargetkan situs anatomi tertentu dan mengurangi dampak buruk pada jaringan sehat. Sasaran penargetan terbagi menjadi sasaran pasif dan aktif. Penargetan pasif menggunakan karakteristik fitokimia dan struktur target situs untuk menyesuaikan bentuk dan ukuran nanopartikel. Sedangkan penargetan aktif menggunakan molekul terkait seperti ligan, antibodi monoklonal, fragmen antibodi yang direkayasa, protein,

peptida, karbohidrat, nutrisi, atau aptamers untuk menghasilkan nanopartikel yang ditargetkan secara aktif. Keuntungan dari penargetan aktif adalah adanya interaksi spesifik antara molekul pada jaringan, sel, atau organel tertentu dengan molekul terkait pada permukaan nanopartikel (Cartaxo, 2018).

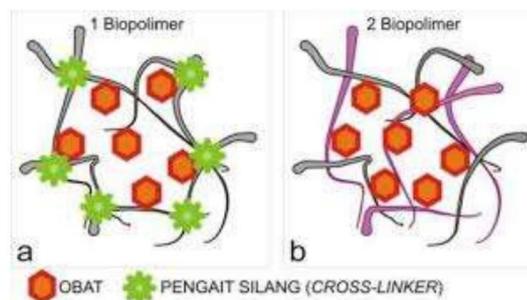
2.4.1 Nanopartikel Gelas Ionik

Nanopartikel gelas ionik merupakan metode pembuatan nanopartikel yang digunakan pada penelitian ini. Metode gelas ionik menggunakan proses ikatan silang pasangan ion multivalent dengan polielektrolit. Metode ini dilakukan pembentukan kompleks antara polielektrolit dan polielektrolit yang berlawanan kemudian diperkuat oleh ikatan silang yang terbentuk. Pembentukan nanopartikel menggunakan gelas ionik dilakukan dengan cara mengeringkan tetes cairan terdispersi dalam fase organik atau minyak. Proses ini dilakukan dengan mencampur dua fase cair, yaitu fase anion polivalen dan fase kitosan (Abdassah, 2015).

Metode gelas ionik memiliki proses yang sederhana, mudah dikontrol, dan tidak menggunakan pelarut organik. Metode ini memiliki prinsip terbentuknya interaksi ionik antara polianion yang bermuatan negatif dengan gugus amino kitosan yang bermuatan positif, yang membentuk struktur tiga dimensi intramolekul. Proses pengikatan silang secara fisika dapat mencegah kemungkinan kerusakan bahan aktif terenkapsulasi dalam bentuk nanopartikel kitosan dan menghindari digunakannya pelarut organik (Mardliyati dkk, 2012).

Kitosan adalah biopolimer alami berupa polisakarida linier yang disusun secara acak oleh β -(1-4)-linked *D-glucosamine* dan *N-acetyl-D-glucosamine*. Saat ini kitosan digunakan secara luas dan komersial pada industri farmasi, pangan,

dan kimia, terutama dalam penghantaran obat-obatan. Hal ini dikarenakan kitosan bersifat melekat pada mukosa, biokompatibel, biodegradable, tidak beracun, dan memiliki tingkat imunogenitas yang rendah, sehingga menjanjikan untuk digunakan sebagai pembawa dalam sistem penghantaran obat (Mardiyati dkk, 2012).



Gambar 2.5 Ilustrasi Matriks Nanopartikel Gelasi Ionik (Abdassah, 2015)

Mekanisme metode gelasi ionik adalah dengan melarutkan kitosan dalam asam kemudian ditambahkan polianion atau polimer anionik sehingga nanopartikel terbentuk secara alami dengan pengadukan pada suhu kamar. Natrium Tripolifosfat (NaTPP) merupakan senyawa polianion tidak beracun yang mampu melakukan interaksi dengan kitosan berdasarkan gaya elektrostatik yang dapat membentuk ikatan silang ionik. NaTPP juga berguna dalam pembuatan butiran dan mikrosfer kitosan dengan cepat membentuk gel. Interaksi antara NaTPP dan kitosan akan membentuk ikatan silang nanopartikel kitosan yang biokompatibel (Qonitannisa dkk, 2020).

2.5 Mekanisme Inflamasi

Inflamasi merupakan suatu respon kekebalan tubuh terhadap rangsangan berbahaya, seperti patogen, kerusakan sel, zat toksik, atau radiasi. Inflamasi bekerja dengan cara mengeliminasi stimulus-stimulus tersebut dan memulai

proses penyembuhan. Fase awal inflamasi ditandai dengan vasodilatasi, kebocoran vascular-mikro disertai reaksi sistemik yang disebut respon fase akut. Hal ini terjadi akibat pelepasan mediator vasoaktif dari sel mast (*histamine*, *leukotriene*), platelet, dan komponen plasma lainnya (bradikinin). Pada fase akut, kerusakan jaringan memicu pelepasan mediator inflamasi, seperti sitokin, peningkatan jumlah leukosit, neutrofil, dan proliferasi limfosit. Sitokin-sitokin seperti interleukin (IL)-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF- α), IL-6, interferon (IFN)-, *transforming growth factor* (TGF)- β , dan IL-8 dilepaskan oleh leukosit, fibroblast, dan sel endothelial sebagai respon awal adanya kerusakan jaringan. Selanjutnya, sitokin memperantarai serangkaian proses inflamasi dan imunitas (Salsabila & Hendri, 2021).

Mekanisme terjadinya inflamasi diawali dengan adanya stimulus yang selanjutnya akan mengakibatkan kerusakan sel, maka sel tersebut akan melepaskan beberapa fosfolipid yang diantaranya adalah asam arakhidonat. Setelah asam arakhidonat bebas, akan mengaktifkan beberapa enzim, yaitu siklooksigenase dan lipooksigenase yang akan merespon adanya inflamasi. Siklooksigenase akan menghasilkan prostaglandin dan trombokan, sedangkan lipooksigenase menghasilkan leukotriene. Hasil metabolisme inilah yang menyebabkan respon inflamasi pada sel atau jaringan terkait (Fitriyanti dkk, 2020).

Respon tubuh terhadap inflamasi membuktikan kesempurnaan ciptaan Allah SWT terhadap tubuh manusia yang secara implisit terdapat dalam Q.S At-Tiin ayat 4:

لَقَدْ خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ فِي أَحْسَنِ تَقْوِيمٍ ﴿٤﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Kami telah menciptakan manusia dalam bentuk yang sebaik-baiknya*” (Q.S At-Tiin: 4)

Berdasarkan tafsir Ibnu Katsir, Allah SWT telah menciptakan manusia dengan bentuk paling baik dan membentuk pendirian yang kokoh, anggota tubuh yang sempurna, dan mempercantiknya. Sedangkan berdasarkan tafsir Al-Mukhtashar di bawah pengawasan Syaikh Dr. Shalih bin Abdullah bin Humaid, Imam Masjidil Haram, diterangkan bahwa Allah SWT menciptakan manusia dengan tubuh yang tegak, sehingga dapat memakan makanannya dengan tangan. Allah SWT juga menciptakannya dengan kemampuan memahami, berbicara, mengatur kebaikan sehingga memungkinkan menjadi khalifah di muka bumi (Robi'aqolbi, 2019). Termasuk dalam melengkapi tubuh manusia dengan berbagai sistem fisiologis, seperti sistem imun yang dapat merespon adanya inflamasi.

Penyebab utama dari inflamasi adalah stress oksidatif. Pada respon inflamasi terjadi pelepasan mediator, termasuk interleukin IL-1, interferon (IFN)- γ , *tumor necrosis factor* (TNF), IL-6, IL-12, IL-18, dan granulosit-makrofag yang merupakan faktor perangsang koloni. Respon inflamasi dapat ditentang ataupun dihambat oleh sitokin antiinflamasi, seperti IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α dan perubahan faktor pertumbuhan. Faktor transkripsi dan faktor nuclear-kB (NF-kB) juga memiliki peran penting dalam respon inflamasi melalui pengaturan berbagai ekspresi gen yang mengkode sitokin proinflamasi, molekul adhesi, kemokin, faktor pertumbuhan, dan enzim yang terinduksi, seperti *cyclooxygenase-2* (COX-2), *5-lipoxygenase* (5-LOX), dan *induced nitric oxide synthase* (iNOS). iNOS, 5-LOX, dan COX-2 dapat merangsang produksi sejumlah mediator proinflamasi, seperti *nitric oxide* (NO), prostaglandin, leukotriene, dan masih banyak lagi (Ashley *et al*, 2012).

2.5.1 Mekanisme Jalur NF- κ B

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) merupakan bagian dari faktor transkripsi yang mengatur sejumlah besar gen yang terlibat dalam berbagai proses imun dan respon inflamasi. Kelompok ini terdiri dari lima anggota, yaitu NF- κ B1 (juga bernama p50), NF- κ B2 (juga bernama p52), RelA (juga bernama p65), RelB dan c-Rel yang memediasi gen transkripsi dengan mengikat elemen DNA tertentu, meningkatkan κ B sebagai hetero atau homodimer bervariasi. Protein NF- κ B biasanya diabaikan di sitoplasme oleh kelompok penghambat protein, termasuk anggota kelompok I κ B dan protein terkait yang ditandai dengan adanya pengulangan ankyrin. Saat ini, anggota kelompok I κ B yang paling penting adalah I κ B α . Selain itu juga terdapat protein prekursor NF- κ B1 dan NF- κ B2, p105 dan p100 yang berfungsi sebagai protein mirip I κ B, karena terminal-C-nya menyerupai struktur I κ B dan memiliki inhibitor fungsi NF- κ B (Liu *et al*, 2017).

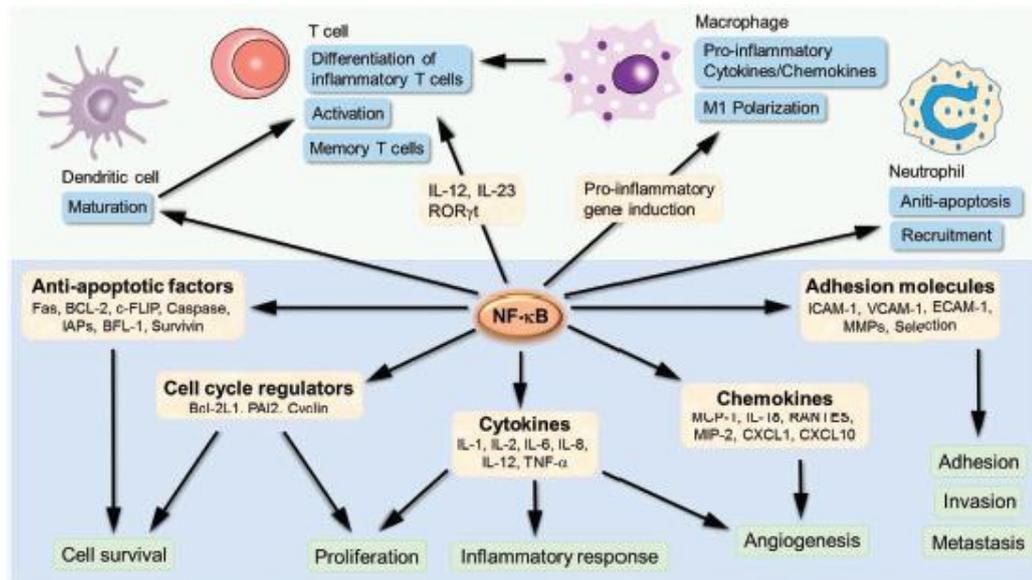
Aktivasi NF- κ B melibatkan dua jalur pensinyalan utama, yaitu jalur kanonik dan nonkanonik. Keduanya penting untuk mengatur kekebalan dan respon inflamasi meskipun terdapat perbedaan mekanisme pensinyalan. Jalur NF- κ B kanonik merespon beragam rangsangan, termasuk ligan berbagai reseptor sitokin, pengenalan pola reseptor (PRR), reseptor TNF (TNFR), serta anggota superfamily reseptor, seperti reseptor sel T (TCR) dan reseptor sel B. Mekanisme utama aktivasi NF- κ B kanonik adalah menginduksi degradasi I κ B α yang dipicu melalui fosforilasi spesifik-situsnya oleh kompleks multi-subunit I κ B kinase (IKK). IKK terdiri dari dua subunit katalitik, IKK α dan IKK β dan α subunit pengatur bernama NF- κ B essential modulator (NEMO) atau IKK γ . IKK dapat diaktifkan oleh

rangsangan yang berbeda, termasuk sitokin, *growth factor*, mitogen, komponen mikroba dan agen stress (Lawrence, 2009).

Berbeda dengan jalur NF-kB kanonik, jalur NF-kB secara selektif merespons kelompok rangsangan tertentu, termasuk ligan dari subset anggota superfamily TNFR, seperti LT β R, BAFFR, CD40 dan RANK. Selain itu, aktivasi NF-kB nonkanonik tidak melibatkan degradasi I κ Ba, melainkan bergantung pada pemrosesan protein precursor NF-kB2, p100. Molekul pensinyalan pusat untuk jalur ini adalah NF-kB-*inducing-kinase* (NIK) yang mengaktifkan dan secara fungsional bekerja sama dengan IKKa untuk memediasi fosforilasi p100, yang pada gilirannya menginduksi p100. Pengolahan p100 melibatkan degradasi struktur seperti C-terminal I κ B menghasilkan generasi NF-kB2, p52 matang dan translokasi nuklir dari kompleks NF-kB non kanonik p52 / RelB. Secara fungsional, NF-kB kanonik terlibat dalam hampir semua aspek rangsangan imun, sedangkan jalur NF-kB nonkanonik tampaknya dikembangkan sebagai sumbu pensinyalan tambahan yang bekerja sama dengan jalur NF-kB kanonik dalam regulasi fungsi spesifik sistem kekebalan adaptif (Lawrence, 2009).

Inflamasi merupakan respon pertahanan tubuh terhadap infeksi dan kerusakan jaringan yang ditandai dengan serangkaian reaksi, termasuk vasodilatasi dan perekrutan sel imun dan protein plasma ke tempat infeksi. NF-kB adalah pusat mediator induksi dan fungsi gen pro-inflamasi baik sel imun bawaan maupun adaptif. Setelah diaktivasi, NF-kB dapat mengaktifkan transkripsi berbagai gen dan dengan demikian mengatur inflamasi. NF-kB menargetkan peradangan tidak hanya secara langsung dengan meningkatkan produksi sitokin inflamasi, kemokin

dan molekul adhesi, tetapi juga mengatur proliferasi sel, apoptosis, morfogenesis, dan diferensiasi (Liu *et al*, 2017).



Gambar 2.6 Gen Target NF- κ B yang Terlibat dalam Perkembangan Inflamasi (Liu *et al*, 2017)

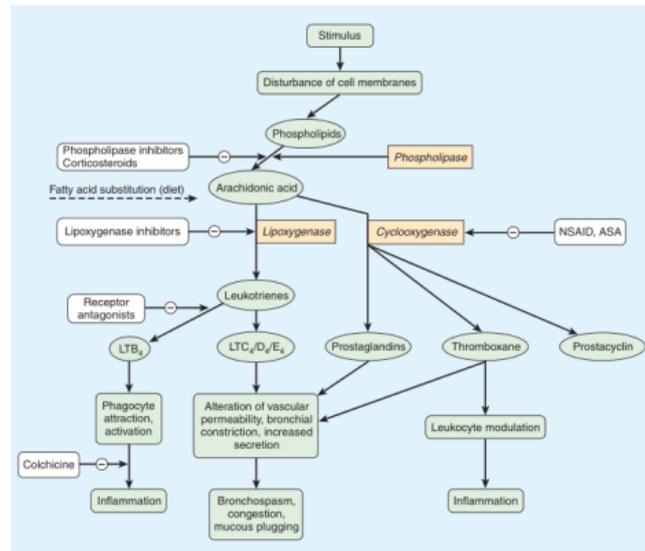
2.5.2 Mekanisme Jalur Enzim Siklooksigenase (COX)

Enzim siklooksigenase merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan prostaglandin, suatu mediator inflamasi dan produk metabolisme asam arakidonat. Enzim COX terdiri dari dua isoenzim, yaitu COX-1 dan COX-2. Enzim COX-1 bersifat konstitutif untuk memelihara fisiologi normal dan homeostasis, sedangkan COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi (Ifora dkk, 2020). COX-1 memiliki 576 asam amino, sementara COX-2 memiliki 581 asam amino. COX-1 memiliki tiga oligosakarida, salah satu oligosakarida berperan dalam pelipatan protein sedangkan COX-2 memiliki empat oligosakarida, di mana satu oligosakarida berperan dalam pelipatan protein dan oligosakarida keempat berperan dalam degradasi protein ini (Rouzer & Marnett, 2009).

COX memiliki tiga domain, yakni domain faktor pertumbuhan epidermal, domain penempelan membran, dan domain terbesar yaitu domain katalitik. COX adalah enzim yang terikat pada membrane sel. Enzim ini tidak memiliki bagian transmembran. Domain penempelan membrane enzim ini terdiri dari struktur seperti kaki-kaki yang membentuk area hidrofobik (Garavito *et al*, 2002). Melalui area ini, COX dapat tetap terikat dengan membrane sel. COX memiliki dua tempat aktif, yakni tempat aktif siklooksigenase dan tempat aktif peroksidase. Tempat aktif siklooksigenase ada di dalam area hidrofobik ini, tepatnya di puncak kanal berbentuk L. Substrat dan penghambat harus memiliki kanal ini untuk mencapai tempat aktif siklooksigenase sedangkan tempat yang berlawanan dengan area hidrofobik ini sebagai tempat aktif peroksidase. Struktur tempat aktif ini menyerupai lembah dengan gugus heme di dasarnya dan gugus asam amino hidrofobik di sekitar lembah tersebut (Kulmacz *et al*, 2003).

Pada proses inflamasi, COX-2 berperan pada proses inisiasi dan resolusi. COX-2 terutama akan diproduksi ketika ada rangsangan berupa liposakarida, interleukin-1, *tumor necrosis factor*, serum, *epidermal growth factor*, *transforming growth factor alpha*, *interferon gamma*, *platelet activating factor*, dan endotelin. COX-1 tetap ada tetapi relatif sedikit dibanding COX-2. Ketika terjadi inflamasi, terjadi peningkatan TXA₂ sebanyak dua kali lipat. Pada saat yang sama, COX-2, prostaglandin I (PGI) sintase, dan prostaglandin E (PGE) sintase akan terstimulasi menyebabkan peningkatan jumlah PGI₂ sebanyak 54 kali lipat dan PGE₂ sebanyak 84 kali lipat. Pada fase lanjut, COX-2 terekspresi lebih banyak dan memicu pembentukan prostaglandin antiinflamasi seperti PGD₂ dan PGI₂, sementara hanya sedikit PGE₂ terbentuk. Induksi COX-2 bersifat

sementara. Jumlah COX-2 akan menurun dalam 24-48 jam setelah pengobatan (Smith & Langenbach, 2001).



Gambar 2.7 Jalur Mekanisme Inflamasi Melalui Enzim Sikloosigenase dan Lipooksigenase (Smith & Langenbach, 2001)

2.6 Pendekatan Bioinformatika

Seiring dengan perkembangan zaman, pengembangan penelitian di bidang obat-obatan mulai membatasi penggunaan hewan coba karena memakan waktu dan biaya besar serta adanya kode etik terhadap penggunaan hewan coba. Pendekatan bioinformatika atau metode *in silico* mulai digunakan karena kebihannya yang murah dan hasilnya lebih cepat. *In silico* merupakan metode riset yang memanfaatkan teknologi komputasi dan database untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut (Makatita dkk, 2020).

Penemuan obat baru dengan metode *in silico* merupakan metode yang tidak ada pada zaman Nabi Muhammad SAW, namun Allah SWT memerintahkan manusia untuk selalu berfikir dan berilmu sehingga dapat memahami ilmu pengetahuan baru yang secara tersirat terdapat dalam Q.S Al-Ankabut ayat 43:


 وَتِلْكَ الْأَمْثَلُ نَضْرِبُهَا لِلنَّاسِ وَمَا يَعْقِلُهَا إِلَّا الْعَالِمُونَ

Artinya: “Dan perumpamaan-perumpamaan ini Kami buat untuk manusia, dan tiada yang akan memahaminya kecuali mereka yang berilmu” (Q.S Al-Ankabut: 43)

Makna ayat di atas menurut Tafsir al-Jalalain adalah (Dan perumpamaan-perumpamaan ini) yang ada dalam Al-Qur’an (Kami buat) Kami jadikan (untuk manusia; dan tiada yang memahaminya) yang akan mengerti akan perumpamaan-perumpamaan ini (kecuali orang-orang yang berilmu) yakni, orang-orang yang berpikir. Ilmu pengetahuan dan teknologi yang berkembang dipandang Islam sebagai kebutuhan manusia dan sebagai objek pelaksanaan kewajiban manusia sebagai makhluk yang berakal (Muslimin, 2014).

Beberapa metode *in silico* yang digunakan untuk pengembangan kandidat obat baru adalah analisis sifat mirip obat (*druglikeness*), prediksi ADME, dan *molecular docking*. Analisis sifat mirip obat menghasilkan skor sifat senyawa terhadap aturan Lipinski yang meliputi berat molekul, nilai koefisien partisi logP, jumlah donor ikatan hidrogen, dan jumlah akseptor ikatan hidrogen. Prediksi profil ADME memperlihatkan berbagai profil absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (Nusantoro, 2020). *Molecular docking* menunjukkan suatu proses yang terjadi antara dua molekul dalam ruang tiga dimensi. *Molecular docking* dapat menentukan dan memprediksi sifat fisika kimia molekul obat dan mengetahui gambaran senyawa dalam berinteraksi dengan reseptor. Hal tersebut dibutuhkan dalam perencanaan dan pengembangan obat baru baik yang berasal dari bahan alam maupun hasil sintesis (Schlick, 2010).

2.6.1 Analisis Sifat Mirip Obat Berdasarkan Aturan Lipinski

Analisis sifat mirip obat digunakan untuk melihat apakah obat dapat digunakan secara oral menggunakan aturan lipinski. Aturan Lipinski merupakan aturan yang dibuat untuk menentukan molekul atau senyawa yang dilihat dari sifat permeabilitas dan absorpsinya. Senyawa obat diharapkan mampu mencapai organ target agar senyawa aktif di dalamnya dapat berinteraksi dengan baik dalam tubuh. Terdapat lima aturan Lipinski yang harus dipenuhi kandidat obat oral. Apabila kandidat obat tersebut tidak memenuhi salah satunya, maka sebaiknya pemberian dilakukan melalui injeksi karena diduga akan membahayakan tubuh manusia (Maftucha dkk, 2022).

Aturan Lipinski yang harus dipenuhi senyawa kandidat obat oral adalah (Syahputra dkk, 2014):

1. Berat molekul kurang dari 500 Dalton.
2. Nilai logP berkisar antara -0,4 sampai 5.
3. Jumlah donor ikatan hidrogen kurang dari 5.
4. Jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10.
5. Nilai *molar refractivity* antara 40 – 130.

Aturan Lipinski dapat menentukan sifat fisikokimia ligan untuk menentukan karakter hidrofobik atau hidrofilik suatu senyawa melalui membrane sel oleh difusi pasif. Nilai logP menyatakan koefisien kelarutan dalam lemak atau air yang memiliki rentang -0,4 sampai 5. Semakin besar nilai log P, maka semakin hidrofobik molekul tersebut. Molekul yang memiliki sifat terlalu hidrofobik cenderung memiliki tingkat toksisitas yang tinggi karena akan tertahan lebih lama pada *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektifitas

ikatan terhadap enzim target menjadi berkurang. Nilai log P yang terlalu negatif juga tidak baik karena molekul tersebut tidak dapat melewati membrane lipid bilayer (Syahputra dkk, 2014).

Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen mendeskripsikan energi yang dibutuhkan berbanding lurus dengan kapasitas ikatan hidrogen agar terjadi proses absorbs. Semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi pula energi yang dibutuhkan, begitupun sebaliknya (Syahputra dkk, 2014). Molekul senyawa obat harus memiliki massa molekul lebih dari 500 Dalton. Apabila massa molekul lebih dari 500 Dalton akan menyebabkan kegagalan terdifusinya molekul atau senyawa tersebut menembus membrane sel (Maftucha dkk, 2022).

Nilai TPSA (*Topological Polar Surface Area*) harus di bawah 140. Nilai TPSA menunjukkan luas permukaan yang diperlukan untuk mengikat sebagian besar reseptor target. Atom oksigen dan nitrogen dalam fragmen kutub berpusat diperhitungkan untuk perhitungan komputasi. TPSA telah terbukti menjadi descriptor yang sangat baik untuk mencirikan absorpsi obat, termasuk absorpsi usus, ketersediaan hayati, permeabilitas, dan penetrasi sawar darah-otak. Senyawa yang memiliki nilai TPSA lebih dari 140 akan cenderung sulit terserap dalam membran sel (Kumar *et al*, 2009).

2.6.2 Prediksi ADME

Prediksi ADME merupakan uji bioinformatika pengembangan obat baru terkait dengan farmakokinetik dan farmakodinamik molekul obat. Prediksi ADME memperlihatkan berbagai profil absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi yang meliputi absorpsi pada usus manusia (*human intestinal absorption*, HIA), bioavailabilitas oral manusia (*human oral bioavailability*, HOB), distribusi sawar

darah otak (*blood brain barrier*, BBB), ikatan protein plasma (*plasma protein binding*, PPB), dan parameter inhibisi serta substrat P-glikoprotein (Pgp) (Nusantoro, 2020).

Sebuah senyawa dikatakan memiliki absorpsi yang baik bila nilai absorpsinya $>80\%$ dan absorpsinya jelek bila $<30\%$. Senyawa dikatakan memiliki permeabilitas kulit yang relatif baik bila memiliki nilai $\log K_p > -2,5$. Volume distribusi (VDSS) merupakan volume teoritis bahwa dosis total obat perlu didistribusikan secara merata untuk memberikan konsentrasi yang sama, seperti pada plasma darah. Semakin tinggi nilai VD, semakin banyak obat yang didistribusikan di jaringan daripada plasma. Senyawa dikatakan memiliki volume distribusi rendah bila nilai $\log VD < -0,15$ dan tinggi bila $> 0,45$ (Hardjono, 2016).

Kemampuan obat untuk menembus sawar darah otak (*Blood Brain Barrier*) merupakan parameter penting yang perlu dipertimbangkan untuk mengurangi efek samping dan toksisitas atau untuk meningkatkan khasiat obat yang aktivitas farmakologisnya ada di dalam otak. Permeabilitas otak-darah diukur sebagai $\log BB$, yaitu rasio logaritmik konsentrasi pada otak terhadap plasma. Senyawa dikatakan mampu menembus sawar darah otak dengan baik bila memiliki nilai $\log BB > 0,3$ dan tak dapat terdistribusi dengan baik bila $\log BB < -1$ (Hardjono, 2016).

Secara umum diketahui bahwa sebagian besar reaksi metabolik akan melibatkan proses oksidasi. Sitokrom P450 adalah enzim detoksifikasi penting dalam tubuh, terutama ditemukan di hati. Sitokrom P450 bekerja dengan cara mengoksidasi senyawa organik asing, termasuk obat dan memfasilitasi ekskresi

senyawa tersebut. Untuk memprediksi proses ekskresi senyawa dapat dilakukan dengan mengukur tetapan *Total Clearance* (CLTOT) dan *Renal Organic Cation Transporter 2* (OCT2) *substrate*. CLTOT merupakan kombinasi dari *hepatic clearance* (metabolisme di hati dan empedu) dan *renal clearance* (ekskresi melalui ginjal). Hal ini terkait dengan bioavailabilitas dan penting untuk menentukan tingkat dosis dalam mencapai konsentrasi *steady-state*. *Organic Cation Transporter 2* adalah transporter pada ginjal yang memegang peran penting dalam disposisi dan clearance obat-obatan dan senyawa endogen. Substrat OCT2 juga berpotensi menimbulkan interaksi sampingan bila diberikan bersamaan dengan inhibitor OCT2 (Hardjono, 2016).

2.6.3 Simulasi *Molecular Docking*

Molecular docking merupakan metode berbasis genetika yang dapat digunakan untuk mencari pola interaksi yang paling tepat dan melibatkan antara dua molekul, yaitu reseptor dan ligan. Ligan sendiri merupakan molekul sinyal kecil yang terlibat dalam kedua proses anorganik dan biokimia. *Molecular docking* bertujuan untuk meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji in-vitro. *Molecular docking* dibagi menjadi 3 berdasarkan fleksibilitas molekul, yaitu Rigid Docking (bersifat rigid atau kaku), semi-fleksible docking (bersifat semi fleksibel) dan fleksible docking (bersifat fleksibel) (Setiawan & Mohammad, 2017).

Tujuan dari *molecular docking* adalah untuk mencapai konformasi protein dan ligan yang optimal. *Docking* membantu dalam mempelajari senyawa obat / ligan atau interaksi reseptor / protein dengan mengidentifikasi situs aktif yang cocok pada protein, mendapatkan geometri terbaik dari kompleks ligan-reseptor.

Docking menjadi dasar untuk penemuan obat secara simulasi komputasi. Langkah pertama dari desain obat dibantu komputer adalah menemukan situs pengikatan ligan protein, yang merupakan kantong atau celah pada permukaan protein yang digunakan untuk mengikat ligan (Setiawan & Mohammad, 2017).

Terdapat tiga ikatan reseptor-ligan yang terbentuk dalam *molecular docking*, yaitu (Voet and Judith, 2011):

a. Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen merupakan suatu interaksi elektrostatik antara gugus donor yang bersifat asam lemah dengan atom dari suatu reseptor yang membentuk pasangan elektron bebas. Ikatan hidrogen ini terbentuk diantara sesama molekul internal (dalam polipeptida) atau antara molekul internal dengan air. Ikatan ini merupakan ikatan utama yang menjaga kestabilan protein.

b. Ikatan Hidrofobik

Interaksi hidrofobik disebabkan karena adanya suatu gaya sehingga senyawa non polar mengatur dirinya sedemikian rupa untuk meminimalkan kontak dengan air atau senyawa amphipatik, membentuk struktur seperti misel di dalam air. Protein yang membentuk misel sebagian besar rantai sampingnya yang bersifat non polar akan menjauhi kontak dengan air, maka adanya interaksi hidrofobik dapat mendukung kestabilan suatu protein.

c. Ikatan Elektrostatik

Ikatan pada interaksi elektrostatik yaitu ikatan ion dan ikatan van der Waals. Ikatan ion merupakan ikatan yang terjadi ketika dua gugus protein yang memiliki muatan berlawanan (pasangan ion) saling berinteraksi. Ikatan ion merupakan ikatan yang kuat tetapi dalam menstabilkan struktur suatu protein tidak terlalu

berperan banyak. Hal ini disebabkan karena pasangan ion yang tersembunyi (*unsolvated*) tidak banyak ditemukan pada protein dan pasangan ion di bagian luar.

Ikatan van der Waals merupakan ikatan yang terjadi karena adanya interaksi elektrostatik diantara dipol-dipol. Ikatan ini khas untuk molekul yang bersifat nonpolar dan bertanggung jawab pada berbagai macam interaksi atom-atom yang berdekatan. Interaksi yang penting dalam pengikatan protein diantaranya adalah interaksi dipol permanen, antara gugus karboksil, dan gugus anida. Walaupun ikatan van der Waals lemah, namun terjadi dalam jumlah besar sehingga memiliki peran yang penting untuk menentukan stabilitas protein.

2.7 Cisplatin

Cisplatin atau *cis*-diammine-dichloroplatinum (II), adalah obat kemoterapi berbasis platinum yang dikenal sebagai klorida pylon sejak abad ke-19. Secara klinis, kompleks platinum digunakan sebagai pengobatan kanker yang bertujuan untuk menginduksi kematian sel tumor. Cisplatin aktif melawan berbagai tumor padat, termasuk kanker ovarium, kanker testis, kanker kandung kemih, kanker usus besar, kanker kepala-leher, dan kanker paru-paru. Cisplatin digunakan untuk respon awal terapi yang berhubungan dengan respon parsial, remisi penyakit lengkap atau stabilisasi penyakit (Khalidah, 2020).

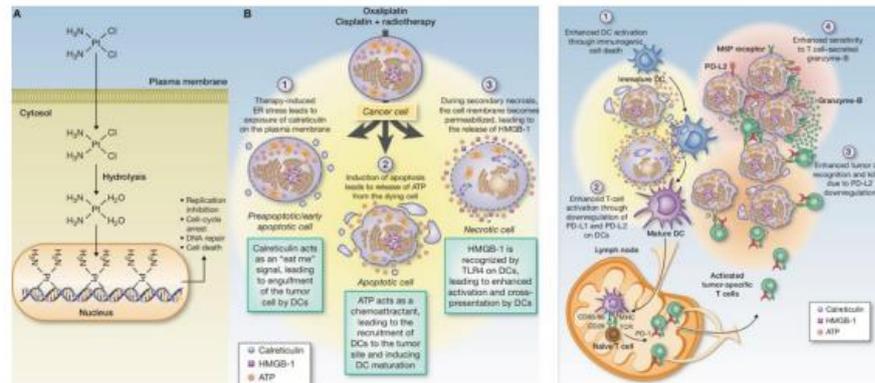
Cisplatin merupakan obat kemoterapi yang terdiri dari ion platinum divalen yang dikelilingi oleh empat ligan, dua gugus amina dan dua gugus lepas (Allen *et al.*, 2020). Struktur kimia dari cisplatin yaitu *cis*-PtCl₂(NH₃)₂. Struktur kimia tersebut sesuai dengan persyaratan struktural klasik yang digunakan sebagai

logam platinum dengan aktivitas anti kanker, yakni: 1) Bilangan oksidasi berupa Pt +2 atau +4. 2) Ligan amina berada pada posisi cis. 3) Muatan total senyawa kompleks platinum adalah netral. 4) Ligan amina (NH_3) memiliki setidaknya satu gugus N-H terminal yang tersisa. 5) Gugus anion dengan kekuatan ikatan sedang seperti klorida atau turunan karboksilat (Malonda, 2017).

Cisplatin berfungsi sebagai obat anti-kanker dengan pemanfaatan ikatan silang antara apoptosis pada sel sehat dan sel kanker dengan DNA (Malonda, 2017). Cisplatin menjadi aktif ketika masuk ke dalam sel. Atom klorida di cisplatin akan tergantikan oleh air saat berada di sitoplasma. Produk terhidrolisis ketika elektrofil kuat bereaksi dengan semua jenis nukleofil, seperti donor nitrat dalam asam nukleat dan gugus sulfhidril dalam protein. Cisplatin akan merusak asam deoksiribonukleat (DNA) sel kanker, mengikat residu purin, menyebabkan apoptosis pada sel, dan mencegah pembelahan sel (Khalidah, 2020).

Pada kondisi fisiologis normal, sel berperan untuk mengontrol keseimbangan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dengan menghilangkannya menggunakan sistem *scavenger* atau pengurangan dismutase superoksida-SOD, katalase-CAT, dan *glutathione*-GSH. Akan tetapi ketika dalam kondisi stres oksidatif, lesi seluler berkontribusi terhadap kerusakan seluler karena adanya ROS berlebih yang dapat merusak protein seluler, lipid, dan DNA. Mekanisme kerja toksisitas cisplatin adalah dengan membentuk stress oksidatif. Mitokondria menjadi target utama penginduksian stress oksidatif oleh cisplatin pada sel kanker. Kerusakan yang terjadi karena stres oksidatif disebabkan oleh proses regulasi *signaling* kalsium, mitogen-activated protein kinase (MAPK), enzim protein kinase C, p38 mitogen-

activated protein kinase (MAPK), jun amino-terminal kinase (JNK), dan AKT yang merusak DNA sel kanker (Khalidah, 2020).



Gambar 2.8 Mekanisme Kerja Cisplatin (Khalidah, 2020)

Terlepas dari efek positif penggunaan platinum, platinum juga dapat menjadi toksin. Pengobatan ini akan menyebabkan efek samping pada pasien yang menerimanya sesuai dosis yang diberikan. Efek samping tersebut berupa kerusakan sel umum, seperti muntah dan mual, penurunan respon terhadap infeksi (imunosupresi), dan penurunan produksi trombosit dan sel darah di sumsum tulang. Kerusakan jangka panjang pada ginjal, saraf, jantung, dan hepar dapat terjadi (Khalidah, 2020). Selain itu, cisplatin juga bersifat gonadotoksik dan menyebabkan penurunan kesuburan baik pada pria maupun wanita (Allen *et al*, 2020).

Pada beberapa penelitian, cisplatin dapat menyebabkan kegagalan ovarium premature, peningkatan apoptosis folikel, penurunan produksi *Anti-Mullerian Hormone*, dan perubahan siklus estrus (Erbas, 2014). Selain itu, cisplatin juga memiliki efek toksik pada folikel primordial berupa penghambatan regenerasi, sehingga dapat menyebabkan kerusakan atau disfungsi ovarium dan infertilitas. Kerusakan ovarium disebabkan oleh rusaknya DNA sehingga terjadi aktivasi

protein c-Abl tirosin kinase yang meningkatkan jumlah protein Tap63. Protein Tap63 ini dapat memediasi apoptosis folikel primordial ovarium (Gonfloni, 2010).

2.8 Sitokin

Sitokin merupakan protein yang dihasilkan sistem kekebalan tubuh untuk melakukan berbagai fungsi penting dalam penanda sinyal sel. Sitokin bergerak menuju jaringan yang terinfeksi dan berikatan dengan reseptor sel tersebut untuk memicu reaksi peradangan. Normalnya, reaksi sitokin berlangsung sebentar dan akan berhenti saat respon kekebalan tubuh terus berdatangan dan bereaksi di luar kendali (Mulyati, 2020). Sitokin menjadi sarana komunikasi antar sel-sel terkait dalam sistem pertahanan tubuh yang diperlukan untuk proliferasi dan diferensiasi sel-sel hematopoitik serta mengatur dan menentukan respon imun (Dy *et al*, 1999).

Sitokin dapat berefek lokal atau sistemik, lokal bekerja pada sel yang memproduksinya (autokrin) atau bekerja pada sel sekelilingnya (parakrin). Bila diproduksi dalam jumlah banyak, sitokin dapat masuk pada aliran darah dan bekerja jauh dari sel yang memproduksinya (endokrin) (Dy *et al*, 1999). Sitokin menjalankan fungsinya sebagai mediator dengan saling berinteraksi antara sitokin sendiri secara sinergis maupun antagonis. Terdapat tiga sifat dari sitokin, yaitu (Abbas *et al*, 2000):

- a. Pleimorfik, yaitu sitokin dapat bekerja pada beberapa sel yang berbeda. Fungsinya untuk menghambat perbanyakan makrofag, differensiasi sel limfosit T helper, serta produksi IgE.

- b. Redundansi (berlebihan), yaitu sejumlah sitokin yang memiliki fungsi atau menstimulasi respon yang sama. Fungsinya untuk perbanyakkan sel limfosit B.
- c. Multifungsi, yaitu sejumlah sitokin yang sama dapat mengatur beberapa fungsi yang berbeda. Terdapat dua macam, yaitu sinergi (bekerjasama menstimulasi respon) dan antagonism (menghambat kerja sitokin lain).

Fungsi sitokin dalam sistem pertahanan tubuh adalah sebagai mediator dan regulator respon imun alami, sebagai mediator dan regulator respon imun didapat, dan sebagai stimulator hematopoiesis. Sitokin yang berperan sebagai mediator dan regulator respon imun alami dihasilkan oleh fagosit mononuklear seperti makrofag dan sel dendrit dan sebagian kecil limfosit T dan sel NK. Sitokin-sitokin tersebut diproduksi sebagai respon terhadap agen molekul tertentu seperti LPS (*Hpopoysaccharide*), *peptidoglykan monomers*, *teicoid acid*, dan DNA *double stranded*. Beberapa sitokin yang penting adalah *tumor necrosis factor* (TNF), IL-1, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 (Abbas *et al*, 2000).

Sitokin-sitokin yang berfungsi sebagai mediator dan regulator sistem imun didapat terutama diproduksi oleh limfosit T yang telah mengenal satu antigen spesifik untuk sel tersebut. Sitokin ini mengatur proliferasi dan differensiasi limfosit pada fase pengenalan antigen dan mengaktifkan sel efektor. Bakteri atau antigen yang berbeda akan merangsang sel T helper CD4+ untuk berdiferensiasi menjadi Th-1 dan Th-2 yang menghasilkan sitokin yang berbeda pula. Beberapa diantaranya penting, yaitu IL-2, IL-4, IL-5, TGF (*transforming growth factor*), IFN- γ , dan IL-13. Sedangkan sitokin yang merangsang hematopoiesis digunakan untuk mengatur hematopoiesis dalam sumsum tulang. Beberapa sitokin yang diproduksi selama respon imunitas alami dan didapat, merangsang pertumbuhan

dan diferensiasi sel-sel progenitor sumsum tulang, CSF, IL-3, GM-CSF, G-CSF merupakan beberapa sitokin yang penting untuk proses hematopoiesis (Medzhitop, 2000).

Terdapat dua macam respon imun yang terjadi ketika patogen masuk ke dalam tubuh, yaitu *innate* dan *adaptive responses*. Sel yang berperan dalam *innate response* adalah sel fagosit (neutrofil, monosit, dan makrofag), sel yang melepaskan mediator inflamasi (basofil, sel mast, dan eosinofil) serta sel *natural killer*. Komponen lain dalam *innate response* ini adalah komplemen, *acute-phase protein* dan sitokin seperti interferon (Delves *et al*, 2000).

Adaptive response meliputi proliferasi *antigen-specific* sel T dan sel B, yang terjadi apabila reseptor permukaan sel ini berikatan dengan antigen. Sel khusus yang disebut dengan *antigen-presenting cells* (APC) mempresentasikan antigen pada MHC dan berikatan dengan reseptor limfosit. Sel B akan memproduksi immunoglobulin, yang merupakan antibodi yang spesifik terhadap antigen yang dipresentasikan oleh sel APC, sedangkan sel T dapat melakukan eradikasi mikroba intraseluler dan membantu sel B untuk memproduksi antibodi (Delves *et al*, 2000).

Sel T CD4 merupakan *cytokine-secreting helper cells*, sedangkan sel T CD8 merupakan *cytotoxickiller cells*. Sel T CD4 secara umum dibagi menjadi dua tipe, yaitu T helper tipe 1 (Th-1) dan T helper tipe 2 (Th-2). Sitokin yang disekresi oleh Th-1 adalah IL-2 dan IFN- γ , sedangkan sitokin yang disekresi Th-2 adalah IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. Sitokin-sitokin ini juga memiliki peranan dalam sistem kontrol. Sekresi IFN- γ akan menghambat sel Th-2 sedangkan sekresi IL-10 akan menghambat sel Th-1 (Asadullah *et al*, 2003).

Sitokin berperan penting dalam penentuan tipe respon imunitas tubuh yang efektif untuk melawan patogen infeksius yang masuk dalam tubuh. Sekresi IL-12 oleh APC akan menyebabkan sekresi IFN- γ dan Th-1. Sitokin akan mengaktivasi makrofag dengan efisien untuk membunuh kuman intraseluler. Secara sederhana digambarkan bahwa produksi sitokin oleh Th-1 memfasilitasi CMI termasuk aktivasi makrofag dan *T-cell-mediated cytotoxicity* (Delves *et al*, 2000).

2.8.1 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

TNF- α merupakan salah satu sitokin yang disekresi oleh sel Th1 dan merupakan sitokin yang utama pada proses inflamasi akut. TNF- α juga diproduksi oleh sel mast, sel endotel, jaringan saraf, dan sel limfosit seperti limfosit T dan B serta sel natural killer (NK). TNF- α biasanya tidak terdeteksi pada individu sehat, tetapi sering ditemukan pada kondisi inflamasi dan infeksi dalam serum. Kadar TNF- α normal sitokin yaitu 1×10^{-9} M (Abbas *et al*, 2007). Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF- α dalam jumlah yang besar dan menimbulkan reaksi sistemik. Pada kadar rendah, TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF- α berperan dalam inflamasi sistemik dan pada kadar tinggi, TNF- α menimbulkan kelainan patologik syok septik (Karyadi dan Ahmad, 2019).

TNF- α memiliki banyak efek biologis, diantaranya pengerahan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi dan juga mengaktifkan sel-sel tersebut guna menyingkirkan mikroba, merangsang makrofag mensekresi kemokin, menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit, serta merangsang fagosit mononuklear untuk mensekresi IL-1 dengan efek yang sama seperti TNF- α (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). TNF- α merupakan sitokin proinflamasi

yang sumbernya dari neutrofil, monosit, dan makrofag. Salah satu mekanisme infeksi yang mungkin terjadi adalah aktivasi yang merangsang monosit dan neutrofil yang memproduksi TNF- α yang menyebabkan gangguan jaringan. Kadar TNF- α yang meningkat menjadi bagian dari pathogenesis infeksi melalui mekanisme sel-sel fagosit yang memicu pelepasan mediator-mediator kimia seperti sitokin TNF- α (Karyadi dan Ahmad, 2019).

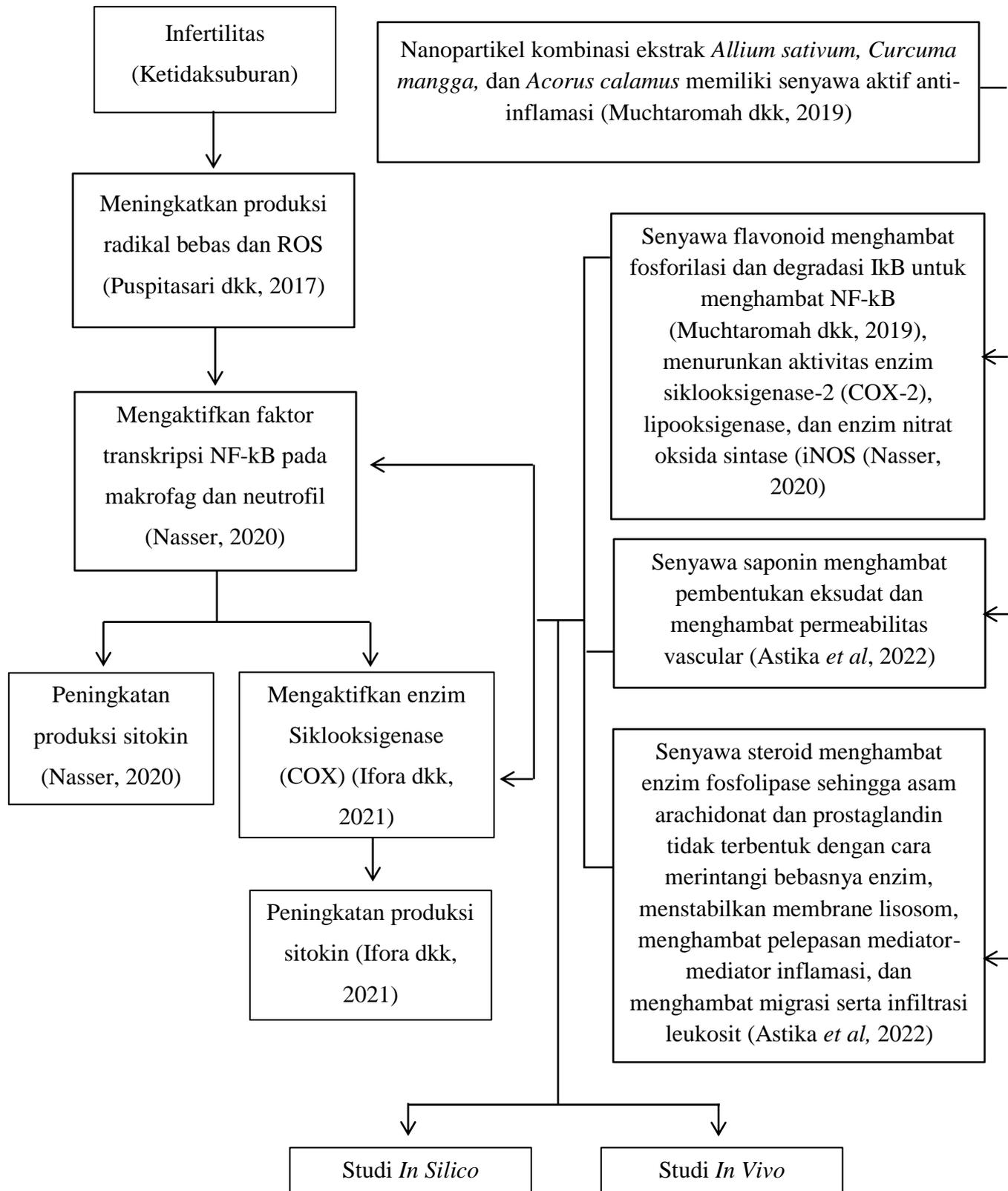
2.8.2 Interferon Gamma (IFN- γ)

Interferon memiliki fungsi biologi masing-masing. Interferon tipe I terkenal karena kemampuannya yang secara langsung menginduksi respon antivirus di dalam sel yang terinfeksi dan sekitarnya melalui peningkatan regulasi molekul yang dapat melawan replikasi virus. Hal ini dikarenakan IFN tipe I terdapat di hampir semua sel sehingga diproduksi lebih awal selama infeksi. IFN ini penting untuk mengaktifkan respon imun *innate* antivirus, seperti fungsi efektor *natural killer cell* (NK). Interferon tipe II atau dikenal dengan IFN γ memiliki nomenklatur yang mirip dengan IFN tipe I, tetapi sinyal melalui reseptor yang berbeda dan memiliki efek yang tidak tergantung pada IFN tipe I. IFN γ memiliki banyak sinonim, seperti *antigen induced interferon*, *immune interferon*, *T interferon*, *mitogen induced*, *interferon*, dan *pH-2labile interferon*. Biosintesis IFN γ berdifat lebih spesifik jika dibandingkan dengan IFN α . Interferon tipe III terbatas pada sel epitel, neutrofil, dan sistem imun yang diaktifkan, memiliki peran yang lebih khusus dalam respon imun mukosa dan dalam regulasi respon adaptif (Jorgovanovic *et al*, 2020).

IFN γ adalah sitokin pleiotrik yang memiliki beberapa fungsi sebagai antivirus, antitumor, dan imunomodulator sehingga berperan penting dalam

mengkoordinasikan respon imun *innate* dan adaptif. Pada keadaan inflamasi, IFN γ memicu respon imun yang merangsang eliminasi patogen, serta mencegah aktivasi berlebihan dari sistem kekebalan dan kerusakan jaringan. IFN γ disekresi terutama oleh limfosit teraktivasi seperti sel T helper 1 (Th1) CD4 dan sel T Sitotoksik CD8, sel natural killer (NK) dan sel penyaji APC. Ekspresinya diinduksi oleh mitogen dan sitokin seperti IL-12, IL-15, IL-18, dan IFN tipe 1. Sementara CD8 dan CD4 merupakan sumber utama IFN γ selama respon adaptif. Faktor transkripsi spesifik yang memulai transkripsi IFN γ tergantung pada sinyal induksi dan tipe sel (Jorgovanovic *et al*, 2020).

2.9 Kerangka Konsep



Penelitian ini menggunakan cisplatin sebagai agen gonadotoksik untuk membuat model mencit infertile. Induksi cisplatin dilakukan dengan injeksi *single dose* dosis 5 mL/kgBB secara intraperitoneal. Penginduksian cisplatin dapat menyebabkan ketidakteraturan siklus estrus serta kerusakan dan disfungsi ovarium memicu terjadinya inflamasi melalui peningkatan radikal bebas dalam tubuh (Hidayat, 2021). Radikal bebas yang terbentuk menyebabkan peningkatan kadar serum faktor transkripsi NFkB. Jalur pensinyalan faktor nuklir *kappa-light-chain-enhancer* dari jalur sel B (NFkB) mendorong makrofag dan neutrofil untuk merespon inflamasi dan meningkatkan ekspresi sitokin dan enzim (Nasser, 2020).

Enzim yang teraktivasi oleh aktivitas faktor transkripsi NFkB adalah siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX) yang menjadi mediator sitokin proinflamasi sehingga produksi sitokin proinflamasi, seperti TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, dan IL-8 meningkat dan menandakan adanya inflamasi dalam tubuh (Ifora dkk, 2021). Pada kondisi inflamasi, sitokin proinflamasi berperan meningkatkan fagositosis dan rekrutmen neutrofil sehingga memediasi inflamasi, sedangkan sitokin antiinflamasi seperti IL-10 akan menghambat aktivitas dari sel Th2, sel NK, dan makrofag. IL-10 diproduksi untuk mengurangi inflamasi yang akan meminimalkan kondisi patologi akibat inflamasi yang berlebihan (Masfufatun dkk, 2018). Pada fase awal inflamasi, terlihat peningkatan sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan aktifnya sel imun. Sitokin proinflamasi dalam jumlah berlebihan dapat merusak dinding vaskular dan mengakibatkan disfungsi organ. Sitokin antiinflamasi seperti IL-10 serta TGF- β dilepaskan untuk mengimbangi jumlah sitokin proinflamasi yang berlebihan (Shafia *et al*, 2020).

Ketidakseimbangan dari mediator inflamasi pada kondisi infertil dapat diatasi dengan penggunaan senyawa antiinflamasi dalam tumbuh-tumbuhan. Senyawa-senyawa antiinflamasi tersebut berasal dari golongan flavonoid, terpenoid, saponin, dan steroid. Senyawa flavonoid diketahui memiliki efek potensial sebagai antiinflamasi. Senyawa flavonoid terbukti dapat menghambat produksi TNF- α dan *nitric oxide* oleh lipopolisakarida dari makrofag yang teraktivasi, supresi TNF- α diduga melalui penghambatan aktivitas NFkB (Muchtarmah dkk, 2019), menurunkan aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2), lipooksigenase, dan enzim nitrat oksida sintase (iNOS) (Nasser, 2020).

Senyawa golongan terpenoid memiliki aktivitas antiinflamasi melalui peningkatan fungsi kognitif dan plastisitas sinaptik dengan menekan aktivitas crogial dan menurunkan regulasi inflamasi yang dimediasi mikroglia sehingga dapat menurunkan kadar IL-1 β dan TNF- α , menghambat aktivitas NFkB, dan menurunkan fosforilasi kinase yang diatur sinyal ekstraseluler (ERK) (Balakrishnan et al, 2022). Senyawa saponin memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menghambat pembentukan eksudat dan menghambat permeabilitas vascular. Senyawa steroid memiliki aktivitas inflamasi melalui penghambatan enzim fosfolipase sehingga asam arachidonat dan prostaglandin tidak terbentuk dengan cara merintangi bebasnya enzim, menstabilkan membrane lisosom, menghambat pelepasan mediator-mediator inflamasi, dan menghambat migrasi serta infiltrasi leukosit (Astika *et al*, 2022).

Penggunaan tanaman herbal dapat dianalisis potensinya melalui pendekatan bioinformatika untuk mengembangkan kandidat obat oral baru. Pendekatan tersebut dilakukan melalui analisis kemiripan obat, prediksi ADME, dan

molecular docking (Daina et al, 2017). Evaluasi sifat mirip obat secara umum dilakukan berdasarkan aturan Lipinski (*rule of five*) untuk melihat apakah obat tersebut dapat digunakan secara oral atau tidak. Aturan Lipinski merupakan aturan yang dibuat untuk menentukan molekul atau senyawa yang dilihat dari sifat permeabilitas dan absorpsinya (Maftucha dkk, 2022).

Prediksi ADME dapat memberikan informasi mengenai karakteristik farmakokinetik dan farmakodinamik dari sebuah molekul obat. Prediksi ADME memperlihatkan berbagai profil absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi yang meliputi absorpsi pada usus manusia (*human intestinal absorption*, HIA), bioavailabilitas oral manusia (*human oral bioavailability*, HOB), distribusi sawar darah otak (*blood brain barrier*, BBB), ikatan protein plasma (*plasma protein binding*, PPB), dan parameter inhibisi serta substrat P-glikoprotein (Pgp) (Nusantoro, 2020). *Molecular docking* dilakukan untuk mengetahui ikatan senyawa uji dan interaksi yang dapat terbentuk antara keduanya (Candra & I Made, 2021). *Molecular docking* membantu mempelajari interaksi antara senyawa obat dengan protein melalui pengidentifikasian situs aktif yang cocok pada protein. *Molecular docking* menjadi dasar untuk penemuan obat secara simulasi komputasi (Setiawan & Mohammad, 2017).

Penelitian ini menggunakan metode nanopartikel tersalut kitosan dalam mengolah *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* yang digunakan sebagai herba untuk mencit infertile. Diharapkan penggunaan nanopartikel dapat meningkatkan potensi *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus* sebagai tanaman obat. Hal ini karena diketahui ukuran nanopartikel antara 10-1000 nm sehingga akan memudahkannya dalam

menembus ruang antar sel, serta meningkatkan aktivitas senyawanya (Abdassah, 2015). Penggunaan nanopartikel digunakan untuk meningkatkan sifat mukoadhesif dari obat sehingga bioavailabilitasnya meningkat dan untuk melindungi senyawa aktif yang terkandung di dalamnya (Marvita dkk, 2021).

Pemberian obat senyawa oral memiliki tantangan, diantaranya obat harus dapat melewati lambung, lumen usus, dan selaput lendir epitel usus. Penggunaan nanopartikel dapat meningkatkan stabilitasnya serta melindunginya dari degradasi enzimatik. Pengaplikasian metode nanopartikel dalam enkapsulasi obat dapat dilakukan menggunakan biopolimer, seperti kitosan. Kitosan memiliki keunggulan berupa dapat membuka epithelial tight junction pada usus sehingga dapat meningkatkan penyerapan pada obat oral (Wang *et al*, 2017).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian analisis potensi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* sebagai kandidat obat antiinflamasi termasuk dalam jenis penelitian *in silico* dari senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam kombinasi tiga tumbuhan tersebut terhadap protein NF-kB (PDB ID: 4IDV) dan reseptor COX-2 (PDB ID: 3LN1) menggunakan perangkat lunak komputer.

Penelitian pengaruh nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, *A. calamus* terhadap profil sitokin mencit yang diinduksi cisplatin termasuk dalam penelitian eksperimental yang dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan 5 perlakuan dan 6 ulangan. Berikut ini adalah pembagian perlakuan:

1. Kontrol negatif (K-) : Mencit yang diberi aquades.
2. Kontrol positif (K+) : Mencit yang diinduksi Cisplatin dengan dosis 5 mL/kgBB dan diberi perlakuan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan dosis 0 mg/kgBB.
3. Perlakuan 1 (P1) : Mencit yang diinduksi Cisplatin dengan dengan dosis 5 mL/kgBB dan diberi perlakuan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan dosis 25 mg/kgBB.
4. Perlakuan 2 (P2) : Mencit yang diinduksi Cisplatin dengan dosis 5 mL/kgBB dan diberi perlakuan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan dosis 50 mg/kgBB.

5. Perlakuan 3 (P3) : Mencit yang diinduksi Cisplatin dengan dosis 5 mL/kgBB dan diberi jamu subur kandungan Ribka Maryam Jokotole dengan dosis 75 mg/kgBB.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian tentang uji potensi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, *A. calamus* sebagai antiinflamasi secara *in-silico* dan *in-vivo* dilaksanakan pada bulan April - Juli 2023. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba, Laboratorium Fisiologi Hewan, dan gedung Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian *in silico* berupa perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan berupa satu set Laptop Hp DLPMTG2 dengan spesifikasi processor AMD A4-5000 APU with Radeon™ HD Graphics 1.50 GHz, RAM 4 GB. Perangkat lunak yang digunakan berupa *Windows 8*, *Discovery Studio Visualizer*, *PassOnline*, *ADMETLab*, *pkCSM*, *Pyrx*, *PyMol*, *RSCB PDB*, *PubChem*, dan *Microsoft Excel 2010*.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian *in vivo* berupa kandang hewan coba, tabung *ependrof* 15 ml, tube 1,5 ml, sonde lambung yang dimodifikasi, cawan petri, saringan *wire*, spatula, timbangan analitik, beaker glass 1000 ml (IWAKI), gelas ukur (IWAKI), erlenmeyer 500 ml (IWAKI), corong, kertas

saring *whatmann*, toples, saringan *mesh*, perangkat *rotary evaporator*, magnetic stirer, homogenizer (IKA T-25 Ultra-Turax), tabung falkon, sentrifuge (Thermo scientific Heracus Labokuge 200), deep freezer, mortar, pistil, *freezer 4⁰C*, vortex, *ultrasonic processor*, oven (Heracus), *hot plate* (Barnstead/thermolyne), inkubator (Memmert UNB 400), shaker, *dissecting set*, papan seksi, labu ukur, spuit, cotton bud, mikropipet (BioRad), tip biru (OneMed), pipet tetes, sentrifuge (Thermo scientific Heracus Labokuge 200), flowsitometer (FACS Calibur TM), *software* Cell Quest Pro TM, spidol, kertas label, aluminium foil, plastik wrap, karet gelang, dan kantong plastik.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian *in silico* adalah protein NF-kB dan reseptor COX-2 dari jalur mekanisme inflamasi dan senyawa-senyawa hasil uji LCMS penelitian sebelumnya dari kombinasi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*.

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian *in vivo* adalah hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) betina, serbuk simplisia *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* yang diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, etanol 70%, asam asetat glasial, aquades, kitosan AAG, tween 80, sodium tripolifosfat (STPP), pakan BR 1, cisplatin, jamu subur kandunganTM Ribka Maryam Jokotole, NaCl 0,9%, spleen.limpa, PBS steril, FITC (Fluoresceinisothiocyanate) (BioLegend).

3.4 Prosedur Penelitian *In Silico*

3.4.1 Analisis Sifat Mirip Obat dan Prediksi Farmakologi ADME

Eksplorasi senyawa metabolit sekunder target kombinasi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dilihat dari hasil LCMS pada hasil penelitian sebelumnya. Kemudian senyawa target *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* diprediksi memiliki aktivitas biologis menggunakan website PASSOnline (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>). Setelah itu dilakukan analisis *druglikeness* dan ADME melalui website ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluasi/indeks>) dan pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>). (Nusantoro & Fadlan, 2020).

3.4.2 Preparasi Protein

Preparasi protein dilakukan dengan mengunduh protein NF-kB (PDB ID: 4IDV) dan reseptor COX-2 (PDB ID: 3LN1) pada website RSCB PDB (<https://www.rcsb.org/structure/>) dengan format PDB. Kemudian dipisahkan struktur protein dari pelarut, *native ligan*, atau residu non standar menggunakan aplikasi Pymol, dengan langkah klik *file* kemudian *open*, dicari tempat file reseptor yang akan dipisahkan, sehingga muncul tampilan tiga dimensi struktur protein. Protein dan pelarut yang tidak diperlukan dihilangkan dengan langkah klik *water/protein chains* kemudian klik *remove*. File *native ligand* tersebut disimpan dalam format .pdb (Prasetiawati dkk, 2021).

3.4.3 Preparasi Ligand

Preparasi ligand dilakukan dengan mengunduh senyawa aktif yang memenuhi aturan Lipinski dan ADME dengan bentuk 3D Conformer pada website PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kemudian preparasi ligand dilakukan menggunakan aplikasi Pyrx, dengan pilih *open babel* dan *insert new item*. Kemudian pilih semua molekul ligand atau senyawa yang digunakan beserta *native ligand* satu persatu. Selanjutnya dilakukan optimasi struktur dengan klik *title* kemudian klik kanan dan pilih *minimize all*. Setelah itu klik kanan dan pilih *convert all to Autodock ligand* (Prasetiawati dkk, 2021).

3.4.4 Penambatan Ligan-Protein

Penambatan ligan-protein dilakukan dengan docking reseptor dengan ligan (struktur senyawa 3D yang telah diskriming) menggunakan aplikasi Pyrx. Pada menu *file* pilih *load molecule* pilih reseptor yang telah dipreparasi kemudian diklik kanan dan pilih *autodock* dan klik *make macromolecule*. Selanjutnya pada menu *Vina Wizard* diklik *start*, kemudian dipilih reseptor dan ligan yang akan ditambatkan. Pada kotak *molecule* pilih menu *file* dan *load molecule*, masukkan file native ligand yang telah dipisahkan. Kemudian klik kanan pilih *display* dan klik *molecular surface*. Selanjutnya diatur grid box dan dicatat koordinat grid box yang digunakan. Setelah itu klik *forward* untuk memulai proses penambatan (Candra dan I Made, 2021).

3.4.5 Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan redocking reseptor dengan *native ligand* untuk validasi reseptor pada website <https://zhanggroup.org/DockRMSD/>. Kemudian dianalisis hasil docking dengan cara dihitung nilai RMSD antara *native ligand* yang tidak didocking dan *native ligand* hasil redocking. Validitas metode ini dinyatakan valid dengan parameter nilai $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$. Nilai ini dicapai dengan melakukan pengaturan *grid box* pada proses validasi sehingga diperoleh nilai RMSD yang diterima (Candra dan I Made, 2021).

3.4.6 Analisis dan Visualisasi

Hasil docking dapat dilihat pada *output* berbentuk tabel pada aplikasi Pyrx. Hasil docking dilakukan dengan memiliki ligan yang memiliki energi ikatan yang paling rendah. Nilai ikatan dilihat pada tabel '*binding affinity*'. Kemudian divisualisasikan interaksi ligan-protein secara 2D dan 3D dengan menggunakan *Discovery Studio Visualizer*. Semakin negatif energi suatu ikatan yang dihasilkan menunjukkan bahwa semakin kuat dan stabil ikatan yang terjadi antara ligan dengan protein target. Interaksi yang terjadi dapat dilihat dari jenis ikatan yang terbentuk (Candra dan I Made, 2021).

3.4.7 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan berdasarkan data hasil uji sifat fisikokimia dan *molecular docking* terhadap senyawa yang berpotensi sebagai bahan obat. Pada uji sifat fisikokimia, parameter uji berdasarkan terpenuhinya

Hukum Lipinski yang meliputi berat molekul (BM), logaritma koefisien partisi oktanol/air (LogP), jumlah ikatan antar atom yang berotasi (Torsion), *Hydrogen Bond Acceptors* (HBA), *Hydrogen Bond Donor* (HBD) (Syahputra dkk, 2014). Hasil disajikan dalam bentuk tabel statistik. Analisis dijabarkan secara deskriptif untuk mengetahui perbedaan nilai afinitas dan interaksi residu asam amino antar senyawa uji (Candra dan I Made, 2021).

3.5 Prosedur Penelitian *In Vivo*

3.5.1 Persiapan Hewan Coba dan Pemberian Cisplatin

Mencit yang digunakan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu pada suhu ruang (20-25⁰C). Mencit diberi pakan berupa pellet BR1 dan minum secara *ad libitum* berupa air mineral selama masa aklimatisasi dan perlakuan. Setelah diaklimatisasi selama 1 minggu, mencit diinduksi Cisplatin dengan dosis 5 mg/kgBB secara intraperitoneal menggunakan injeksi *single dose* (Akunna *et al*, 2017).

3.5.2 Pengecekan Siklus Estrus Menggunakan Metode Apus Vagina

Siklus estrus mencit dilakukan pengecekan sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pukul 06.00 dan 18.00 WIB. Sampel diambil dari vagina mencit yang diapus sebanyak 1-2 kali putaran menggunakan *cotton bud* yang dibasahi NaCl 0,9%. Kemudian dioleskan pada objek glass dan dikering-anginkan pada suhu ruang. Setelah kering, dilakukan fiksasi pada apusan vagina selama 3 menit menggunakan larutan etanol 10% dan dibilas menggunakan air mengalir, kemudian diangin-anginkan. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan selama 15 menit

menggunakan pewarna Giemsa, setelah itu dicuci dengan air dan dikeringkan. Setelah kering dilakukan pengamatan apusan vagina dan ditentukan fase siklusnya menggunakan mikroskop yang tersambung dengan kamera optiklab pada perbesaran 100x (Ajayi & Roland, 2020).

3.5.3 Preparasi Sampel Tanaman dan Ekstraksi Dengan Metode Maserasi

Sampel yang digunakan berupa serbuk simplisia umbi *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*. Sebanyak 36 gram serbuk *A. sativum*, 36 gram serbuk *C. mangga*, dan 28 gram serbuk *A. calamus* direndam dalam 70% etanol pada perbandingan 1:4 dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar (Mughtaromah dkk, 2020). Setelah itu disaring menggunakan kertas saring. Endapan yang didapatkan dimaserasi kembali hingga 3 kali ulangan sampai mendapatkan filtrat yang bening. Filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C, putaran 120 rpm, dan tekanan 20 psi (Susanty & Fairus, 2016)

3.5.4 Pembuatan Nanopartikel Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*

Pembuatan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dilakukan dengan dilarutkan asam asetat glasial 0,5% pada 100 mL aquades dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Kemudian ditambahkan serbuk kitosan 0,5% dan kembali dicampur dengan *magnetic stirrer*. Di samping itu, dilarutkan STPP 0,5% dalam 20 mL aquades dan dihomogenkan menggunakan homogenizer selama 10 menit 1000 rpm. Larutan kitosan-AAG dan STPP dicampur dan dihomogeneizer selama 10 menit 1000 rpm. Setelah homogen, dilanjutkan dengan

penambahan ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* sebanyak 0,1 gram dan dihomogenizer selama 30 menit 3000 rpm (Pakki dkk, 2016)

Proses selanjutnya, ditambahkan Tween 80 sebanyak 1 mL dan dihomogenkan menggunakan homogenizer selama 90 menit 10.000 rpm. Hasil campuran larutan tersebut kemudian dilakukan sonikasi selama 90 menit menggunakan frekuensi 20kHz dan amplitudo 90%. Kemudian diletakkan pada tabung *ependorf* 15 mL dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan berbentuk cairan dibuang dan pellet diletakkan dalam *freezer* selama 24 jam dan dibiarkan liofilisasi untuk mendapatkan serbuk nanopartikel. Serbuk yang terbentuk digerus dan diayak menggunakan ayakan *mesh* kemudian disimpan untuk perlakuan (Pakki dkk, 2016).

3.5.5 Pemberian Nanopartikel Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*

Pemberian nanopartikel ekstrak digunakan metode pencekakan atau sonde lambung menggunakan spuit 2 mL setelah dinyatakan infertil dengan siklus estrus yang tidak teratur dan berada pada fase diestrus. Nanopartikel ekstrak diberikan setiap hari selama 15 hari (tiga kali siklus estrus) (Rosdianto dkk, 2016) sebanyak dosis masing-masing perlakuan.

3.5.6 Pembedahan Mencit dan Pengambilan Limpa

Mencit didislokasi leher terlebih dahulu, kemudian diletakkan pada papan *section* yang telah disemprot alkohol. Mencit dibedah pada bagian peritoneal dan diambil organ limpa. Selanjutnya limpa dicuci dengan PBS steril 2-3 kali kemudian diletakkan pada cawan petri dan dipencet menggunakan pangkal spuit

searah jarum jam. Organ limpa tersebut disaring dan dimasukkan dalam tabung *ependrof* 15 mL, diberi PBS sekitar 5 mL, kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet ditambahkan 1 mL PBS steril dan diresuspensi menggunakan mikropipet. Selanjutnya disimpan sebagai bahan uji flowsitometri (Roffico & Muhammad, 2014).

3.5.7 Pengukuran Kadar Sitokin dengan *Flowcytometry*

Metode pengukuran kadar sitokin dilakukan dengan metode *flowcytometry*. Suspensi yang telah terbentuk dan disimpan, diambil 50 μ L dan dipindahkan ke dalam mikrotube 1,5 mL. Pellet yang telah dipindahkan, ditambah antibodi spesifik (PE Anti Mouse TNF- α , PE Anti Mouse IFN- γ , Anti CD⁴-FITC, Anti CD⁸-PE), kemudian dihomogenkan dengan vortex. Campuran yang telah homogeny, diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, kemudian dipindahkan ke kuvet FCM. Analisis FCM dilakukan dengan instrument flowsitometri dari *Flowcytometry* FACS CaliburTM (Roffico & Muhammad, 2014).

3.5.8 Analisis Data

Data yang didapat dianalisis menggunakan *software* SPSS 25. Data diuji normalitasnya dengan uji *Klomagrov – smirnov*. Jika didapatkan nilai $p > 0,05$ maka data berdistribusi normal. Data diuji homogenitasnya dengan uji *Lavene test*. Data dinyatakan homogen jika didapatkan nilai $p > 0,05$. Data yang normal dan homogen, diteruskan dengan uji *one way ANOVA*. Apabila didapatkan nilai $p < 0,05$ maka antar perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan sehingga perlu diteruskan ke uji lanjut Duncan (Field, 2009).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Studi *In-Silico*

4.1.1 Skrining Aktivitas Antiinflamasi

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam kombinasi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* berdasarkan hasil LCMS penelitian Muchtaromah *et al* (2017) sebelumnya, didapatkan 123 senyawa (Lampiran 2). Kemudian 123 senyawa tersebut diprediksi aktivitas biologisnya sebagai antiinflamasi menggunakan website PassOnline (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>). Hal ini sesuai dengan Hussain *et al* (2016) bahwa PASS (*Predicted Activity Spectrum for Substances*) merupakan server yang dapat memprediksi aktivitas spectrum senyawa kimia sebagai Pa (*probable activity*) dan Pi (*probable inactivity*). Probabilitas Pa dan Pi bervariasi antara 0,000 hingga 1,000. Senyawa yang menunjukkan nilai Pa lebih tinggi dari Pi adalah satu-satunya konstituen yang dianggap mungkin untuk aktivitas farmakologis tertentu. Hasil prediksi PASS aktivitas antiinflamasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil prediksi PASS aktivitas antiinflamasi

No.	Senyawa	Pa	Pi	Activity
1.	Allyl mercaptan	0,714	0,017	Complement factor D inhibitor
2.	Tropone	0,908	0,003	Complement factor D inhibitor
		0,829	0,005	Antiinflammatory
3.	Diallyl sulfide	0,782	0,008	Complement factor D inhibitor
4.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	0,798	0,007	Complement factor D inhibitor
5.	Azulene	0,881	0,004	JAK2 expression inhibitor
		0,742	0,004	Prostaglandin-A1 DELTA-isomerase inhibitor
		0,710	0,004	Leukotriene-B4 20-monooxygenase inhibitor
6.	Diallyl disulfide	0,743	0,013	Complement factor D inhibitor
7.	Camphor	0,743	0,013	JAK2 expression inhibitor

8.	Dipropyl disulfide	0,718	0,005	Prostaglandin-A1 DELTA-isomerase inhibitor
9.	p-coumaric acid	0,865	0,004	JAK2 expression inhibitor
		0,740	0,004	Leukotriene-B4 20-monooxygenase inhibitor
		0,737	0,005	TNF expression inhibitor
		0,711	0,015	Prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor
10.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	0,849	0,005	JAK2 expression inhibitor
		0,810	0,006	Complement factor D inhibitor
11.	Methylisoeugenol	0,917	0,003	JAK2 expression inhibitor
		0,785	0,004	TNF expression inhibitor
12.	Caffeic acid	0,879	0,004	JAK2 expression inhibitor
		0,765	0,004	TNF expression inhibitor
		0,717	0,004	Leukotriene-B4 20-monooxygenase inhibitor
13.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	0,860	0,004	Complement factor D inhibitor
		0,735	0,004	Prostaglandin-A1 DELTA-isomerase inhibitor
14.	Ferulic acid	0,915	0,003	JAK2 expression inhibitor
		0,819	0,003	TNF expression inhibitor
15.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	0,785	0,009	JAK2 expression inhibitor
16.	Isoasarone	0,761	0,011	JAK2 expression inhibitor
17.	Beta-asarone	0,860	0,004	JAK2 expression inhibitor
		0,739	0,005	TNF expression inhibitor
18.	Acolamone	0,815	0,009	Prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor
19.	Isoshyobunone	0,775	0,008	Antiinflammatory
20.	Shyobunon	0,731	0,012	Antiinflammatory
21.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	0,778	0,010	JAK2 expression inhibitor
22.	Isoacoramone	0,758	0,012	JAK2 expression inhibitor
23.	Sinapic acid	0,888	0,004	JAK2 expression inhibitor
		0,759	0,004	TNF expression inhibitor
24.	Calamendiol	0,742	0,013	Prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor
25.	Acoric acid	0,803	0,009	Prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor
26.	Galangin	0,784	0,002	NOS2 expression inhibitor
		0,742	0,013	JAK2 expression inhibitor
		0,712	0,003	Interleukin 4 antagonist
27.	Apigenin	0,798	0,008	JAK2 expression inhibitor
		0,795	0,003	Leukotriene-B4 20-monooxygenase inhibitor

		0,732	0,002	NOS2 expression inhibitor
28.	Naringenin	0,846	0,002	NOS2 expression inhibitor
29.	Kaempferol	0,797	0,002	NOS2 expression inhibitor
		0,745	0,013	JAK2 expression inhibitor
		0,722	0,003	Interleukin 4 antagonist
		0,709	0,004	Leukotriene-B4 20-monooxygenase inhibitor
30.	Fisetin	0,833	0,006	JAK2 expression inhibitor
		0,799	0,002	NOS2 expression inhibitor
31.	Catechin	0,785	0,009	JAK2 expression inhibitor
32.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	0,917	0,003	JAK2 expression inhibitor
		0,812	0,004	TNF expression inhibitor
		0,723	0,013	Antiinflammatory
33.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	0,771	0,004	TNF expression inhibitor
34.	Quercetin	0,850	0,002	NOS2 expression inhibitor
		0,787	0,009	JAK2 expression inhibitor
35.	Copallic acid	0,706	0,015	Antiinflammatory
		0,704	0,015	Prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor
36.	Bis-demethoxycurcumin	0,962	0,001	JAK2 expression inhibitor
		0,825	0,003	TNF expression inhibitor
		0,704	0,015	Antiinflammatory
37.	Myricetin	0,808	0,002	NOS2 expression inhibitor
		0,733	0,014	JAK2 expression inhibitor
		0,720	0,013	Antiinflammatory
		0,710	0,003	Interleukin 4 antagonist
38.	N-cis-feruloyltyramine	0,794	0,009	JAK2 expression inhibitor
39.	Leucocyanidin	0,787	0,009	JAK2 expression inhibitor
40.	N-trans-feruloyloctopamine	0,863	0,003	TNF expression inhibitor
		0,748	0,013	JAK2 expression inhibitor
41.	Zerumin B	0,779	0,008	Antiinflammatory
42.	Demethoxycurcumin	0,978	0,001	JAK2 expression inhibitor
		0,901	0,002	TNF expression inhibitor
43.	Lupiwighteone	0,727	0,013	Antiinflammatory
44.	Calcaratarin A	0,714	0,014	Antiinflammatory
45.	Allithiamine	0,828	0,005	Antiinflammatory
46.	Curcumin	0,764	0,004	TNF expression inhibitor
47.	S(2-carboxypropyl) glutathione	0,704	0,001	Leukotriene-C4 synthase inhibitor
48.	Squalene	0,753	0,004	TNF expression inhibitor
		0,701	0,016	Antiinflammatory
49.	Acoradin	0,801	0,008	JAK2 expression inhibitor
50.	Diosgenin	0,766	0,009	Antiinflammatory
51.	Tigogenin	0,714	0,014	Antiinflammatory
52.	B-amyrin	0,843	0,005	Antiinflammatory

		0,728	0,003	Interleukin 6 antagonist
53.	Lupeol	0,708	0,015	Antiinflammatory
54.	Gitogenin	0,790	0,008	Antiinflammatory
55.	B-chlorogenin	0,733	0,012	Antiinflammatory
56.	Reynoutrin	0,783	0,008	Antiinflammatory
57.	Astragalin	0,748	0,010	Antiinflammatory
58.	Quercetin-3-O-rhamnoside	0,754	0,010	Antiinflammatory
59.	Agigenin	0,803	0,007	Antiinflammatory
60.	Hirsutrin	0,725	0,013	Antiinflammatory
61.	Myricetin 3-rhamnoside	0,762	0,009	Antiinflammatory
62.	Isoquercitrin	0,739	0,011	Antiinflammatory
63.	Kaempferol 3-(2''-acetylramnoside)	0,737	0,012	Antiinflammatory
64.	Kaempferol 3-(3''-acetylramnoside)	0,752	0,010	Antiinflammatory
65.	Kaempferol 3-(4''-acetylramnoside)	0,759	0,009	Antiinflammatory
66.	Curcumanggoside	0,739	0,011	Antiinflammatory
67.	Kaempferol 3-(2'',4''-diacetylramnoside)	0,746	0,011	Antiinflammatory
68.	Kaempferol 3-(3'',4''-diacetylramnoside)	0,759	0,009	Antiinflammatory
69.	Rutin	0,728	0,013	Antiinflammatory
70.	Myricetin 3-rutinoside	0,752	0,010	Antiinflammatory
71.	Eruboside B1	0,762	0,009	Antiinflammatory
72.	Sativoside-R2	0,763	0,009	Antiinflammatory

Berdasarkan Tabel 4.1, prediksi PASS pada penelitian ini mendapatkan total 72 senyawa yang memiliki aktivitas antiinflamasi dengan nilai $P_a > 0,7$. Hal ini menunjukkan bahwa 72 senyawa tersebut memiliki aktivitas antiinflamasi yang tinggi dan dapat dijadikan obat komersial. Sesuai dengan Fakhri *et al* (2021) bahwa prediksi PASS diinterpretasikan dalam rentang yang fleksibel, yaitu (i) Nilai $P_a > P_i$ dianggap memiliki kemungkinan aktif; (ii) Nilai $P_a > 0,7$ memiliki peluang aktif secara eksperimen tinggi; (iii) Nilai $0,7 < P_a < 0,5$ memiliki peluang eksperimental tetapi senyawanya berbeda dengan agen farmasi yang sudah diketahui; (iv) Nilai $P_a < 0,5$ memiliki peluang secara eksperimental rendah.

Terdapat beberapa bioaktivitas senyawa kimia yang terkandung dalam nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*, yaitu antiinflamasi, penghambat prostaglandin, penghambat leukotriene, inhibitor ekspresi JAK, penghambat faktor komplemen, inhibitor TNF, dan inhibitor interleukin. Hal ini sesuai dengan Fadilaturahmah dkk (2022) bahwa prostaglandin dan leukotriene merupakan mediator inflamasi yang menyebabkan nyeri, vasodilatasi, dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Ketika pembentukan prostaglandin terhambat, maka gejala-gejala tersebut dapat diatasi. Sedangkan JAK berkaitan dengan pensinyalan seluler yang mengatur pelepasan sitokin.

4.1.2 Analisis Sifat Mirip Obat (*Drug-likeness*)

Hasil analisis PASS mendapatkan 72 senyawa yang memiliki aktivitas antiinflamasi, selanjutnya dilakukan analisis sifat mirip obat (*druglikeness*) melalui website SWISS ADME (<https://swiss.adme.ch>) dan mengacu pada *Lipinski Rule of Five*. Hal ini sesuai dengan Fadlan *et al* (2021) bahwa *druglikeness* mengacu pada pemberian obat secara oral yang berhubungan dengan proses absorpsi dan distribusi obat. Kriteria obat yang baik harus mengikuti sebuah aturan *Lipinski Rule of Five*, yaitu berat molekul <500 g/mol. Log P <5, donor ikatan hidrogen <5, akseptor ikatan hidrogen <10, dan *refractory molar* antara 40 -130. Aturan Lipinski menghubungkan parameter farmakokinetika dan sifat fisikokimia. Data analisis sifat mirip obat (*druglikeness*) dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji *druglikeness* menurut aturan *Linpinski Rule of Five*

No	Senyawa	BM (<500 g/mol)	HBD (<5)	HBA (<10)	LogP (-0,4 - 5)	RM (40 – 130)	Hasil
1.	Allyl mercaptan	74.14	0	0	1.10	23.99	-
2.	tropone	106.12	0	1	1.05	32.71	-
3.	Diallyl sulfide	114.21	0	0	2.09	37.60	-
4.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	144.26	0	0	2.49	43.08	√
5.	azulene	128.17	0	0	2.79	43.06	√
6.	Diallyl disulfide	146.27	0	0	2.74	45.19	√
7.	camphor	152.23	0	1	2.40	45.64	√
8.	Dipropyl disulfide	150.31	0	0	3.19	46.14	√
9.	p-coumaric acid	164.16	2	3	1.38	45.13	√
10.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	168.15	0	4	0.20	40.08	√
11.	methylisoeugenol	178.23	0	2	2.63	54.32	√
12.	Caffeic acid	180.16	3	4	1.09	47.16	√
13.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	180.35	0	0	3.59	51.61	√
14.	Ferulic acid	194.18	2	4	1.39	51.63	√
15.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	196.20	0	4	1.52	51.31	√
16.	isoasarone	208.25	0	3	2.44	60.02	√
17.	Beta-asarone	208.25	0	3	2.64	60.82	√
18.	Acolamone	220.35	0	1	3.98	69.46	√
19.	Isoshyobunone	220.35	0	1	4.14	71.10	√
20.	Shyobunon	220.35	0	1	4.01	71.10	√
21.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	224.25	0	4	1.84	60.70	√
22.	Isoacoramone	224.25	0	4	2.31	60.92	√
23.	Sinapic acid	224.21	2	5	1.40	58.12	√
24.	Calamendiol	238.37	2	2	2.89	71.92	√
25.	Acoric acid	268.35	1	4	2.70	74.02	√
26.	Galangin	270.24	3	5	2.58	73.99	√
27.	Apigenin	270.24	3	5	2.58	73.99	√
28.	Naringenin	272.25	3	5	2.19	71.57	√
29.	Kaempferol	286.24	4	6	2.28	76.01	√
30.	Fisetin	286.24	4	6	2.28	76.01	√
31.	Catechin	290.27	5	6	1.22	74.33	√
32.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	292.33	2	3	3.73	89.14	√
33.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	299.32	4	4	1.53	83.65	√
34.	Quercetin	302.24	5	7	1.99	78.03	√
35.	Copallic acid	304.47	1	2	5.60	94.33	-
36.	Bis-demethoxycurcumin	308.33	2	4	3.13	89.82	√
37.	myricetin	318.24	6	8	1.69	80.06	-
38.	N-cis-feruloyltyramine	313.35	3	4	2.37	88.98	√
39.	Leucocyanidin	306.27	6	1	0.39	75.50	-
40.	N-trans-feruloyloctopamine	329.35	4	5	1.54	90.14	√
41.	Zerumin B	334.45	2	4	3.34	94.05	√

No	Senyawa	BM (<500 g/mol)	HBD (<5)	HBA (<10)	LogP (-0,4 - 5)	RM (40 - 130)	Hasil
42.	demethoxycurcumin	338.35	2	5	3.14	96.31	√
43.	Lupiwighteone	338.35	3	5	4.09	97.71	√
44.	Calcaratarin A	348.52	0	3	5.31	104.54	-
45.	Allithiamine	354.49	2	4	2.36	98.51	√
46.	Curcumin	368.38	2	6	3.15	102.80	√
47.	S(2-carboxypropyl)glutathione	393.41	6	9	-1.68	91.03	-
48.	Squalene	410.72	0	0	10.60	143.48	-
49.	Acoradin	416.51	0	6	4.89	116.77	√
50.	Diosgenin	414.62	1	3	5.71	121.59	-
51.	Tigogenin	416.64	1	3	5.79	122.07	-
52.	B-amyrin	426.72	1	1	8.17	134.88	-
53.	Lupeol	426.72	1	1	8.02	135.14	-
54.	Gitogenin	432.64	2	4	4.76	123.23	√
55.	B-chlorogenin	432.64	2	4	4.76	123.23	√
56.	Reynoutrin	434.35	7	11	0.10	104.19	-
57.	Astragalin	448.38	7	11	-0.24	108.13	-
58.	Quercetin-3-O-rhamnoside	448.38	7	11	0.49	109.00	-
59.	Agigenin	448.64	3	5	3.74	124.39	√
60.	Hirsutrin	462.40	7	11	0.88	113.80	-
61.	Myricetin 3-rhamnoside	464.38	8	12	0.19	111.02	-
62.	Isoquercitrin	464.38	8	12	-0.54	110.16	-
63.	Kaempferol 3-(2''-acetylramnoside)	474.41	5	11	1.35	116.71	-
64.	Kaempferol 3-(3''-acetylramnoside)	474.41	5	11	1.35	116.71	-
65.	Kaempferol 3-(4''-acetylramnoside)	474.41	5	11	1.35	116.71	-
66.	Curcumanggoside	512.59	5	10	0.23	125.88	-
67.	Kaempferol 3-(2'',4''-diacetylramnoside)	516.45	4	12	1.92	126.45	-
68.	Kaempferol 3-(3'',4''-diacetylramnoside)	516.45	4	12	1.92	126.45	-
69.	Rutin	610.52	10	16	-1.69	141.38	-
70.	Myricetin 3-rutinoside	626.52	11	17	-1.98	143.40	-
71.	Eruboside B1	1081.20	14	24	-3.94	252.76	-
72.	Sativoside-R2	1197.31	15	27	-4.45	278.02	-

Keterangan: BM = Berat molekul, HBA = Akseptor ikatan hidrogen, HBD = Donor ikatan hidrogen, MLogP = Koefisien partisi oktanol / air, RM = Refractory Molar

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa dari 72 senyawa yang memiliki aktivitas antiinflamasi berdasarkan uji PASS, sebanyak 41 senyawa memenuhi aturan

Lipinski Rule of Five sehingga dapat diberikan secara oral. Hal ini sesuai dengan Mardianingrum *et al* (2021), bahwa nilai berat molekul berhubungan dengan proses distribusi obat yang terjadi dengan cara menembus membran biologis melalui proses difusi. Senyawa dengan berat molekul > 500 g/mol akan sulit menembus membrane biologis sehingga waktu absorpsi obat akan membutuhkan waktu yang lama. Sebaliknya, senyawa yang memiliki berat molekul lebih kecil akan lebih mudah menembus membrane biologi.

Mardianingrum *et al* (2021) juga menjelaskan bahwa nilai log P berhubungan dengan hidrofobisitas atau lipofilisitas suatu senyawa. Semakin besar nilai log P maka senyawa akan bersifat hidrofobik. Jika nilai log P > 5 menyebabkan suatu senyawa akan lebih lama tinggal di *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh. Hal ini menyebabkan selektivitas ikatan terhadap enzim target menjadi berkurang dan cenderung memiliki toksisitas yang lebih tinggi. Nilai log P senyawa tidak boleh negatif karena tidak dapat melewati membran *lipid bilayer* dan memungkinkan terjadi interaksi dengan pelarut air. Jumlah ikatan hidrogen pada donor dan akseptor berkorelasi dengan aktivitas biologis suatu senyawa. Semakin tinggi kapasitas ikatan pada donor dan akseptor, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi. *Refractory molar* adalah suatu nilai total polarisabilitas dari suatu molekul obat, di mana suatu senyawa non polar dapat membentuk momentum agar senyawa dapat berikatan dengan reseptor dan sifat polar berfungsi agar sisa dari metabolisme senyawa dapat diekskresikan dari tubuh.

4.1.3 Analisis ADME

Tahap selanjutnya dalam pemilihan senyawa potensial antiinflamasi adalah prediksi aspek farmakokinetika atau ADME dan toksisitasnya melalui situs berbasis web yaitu ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluasi/indeks>) dan pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>).

Parameter yang digunakan pada prediksi absorpsi adalah nilai *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan permease sel CaCo-2. Parameter uji distribusi yang digunakan adalah *Plasma Protein Binding* (PPB) dan *Blood Brain Barrier* (BBB).

Hasil prediksi absorpsi dan distribusi dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil analisis absorpsi dan distribusi

No.	Senyawa	Absorpsi		Distribusi	
		HIA (%)	CaCo-2	PPB (%)	BBB
1.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	94.90	-2.69	81.68	0.37
2.	Diallyl disulfide	94.76	1.39	77.53	0.78
3.	camphor	95.96	1.49	79.21	0.61
4.	Dipropyl disulfide	93.81	1.39	84.55	0.76
5.	p-coumaric acid	93.49	1.21	85.36	-0.22
6.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	100	1.18	82.30	-0.26
7.	methylisoeugenol	95.48	1.79	93.99	0.32
8.	Caffeic acid	69.40	0.63	87.70	-0.64
9.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	90.71	1.40	74.97	0.74
10.	Ferulic acid	93.68	0.17	89.75	-0.23
11.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	96.74	1.29	65.35	-0.17
12.	isoasarone	94.80	1.70	87.42	0.29
13.	Beta-asarone	95.49	1.91	89.50	0.22
14.	Acolamone	96.43	1.54	96.44	0.63
15.	Isoshyobunone	95.47	1.43	95.66	0.60
16.	Shyobunon	97.17	1.33	95.66	0.62
17.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	97.09	1.31	60.51	-0.08
18.	Isoacoramone	96.65	1.33	68.93	-0.12
19.	Sinapic acid	93.06	0.27	88.79	-0.24
20.	Calamendiol	94.00	1.60	61.74	0.32
21.	Acoric acid	97.36	1.22	87.84	-0.11
22.	Galangin	93.98	0.99	98.59	-0.74
23.	Apigenin	93.25	1.00	97.25	-0.73
24.	Naringenin	91.31	1.02	93.76	-0.57
25.	Kaempferol	74.29	0.03	97.86	-0.93

No.	Senyawa	Absorpsi		Distribusi	
		HIA (%)	CaCo-2	PPB (%)	BBB
26.	Fisetin	83.75	0.05	97.04	-1.03
27.	Catechin	68.82	-0.28	92.06	-1.05
28.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	90.80	1.30	100.32	-0.17
29.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	91.60	0.90	93.64	-0.73
30.	Quercetin	77.20	-0.22	95.49	-1.09
31.	Bis-demethoxycurcumin	91.15	0.95	99.28	-0.08
32.	N-cis-feruloyltyramine	90.23	0.92	96.83	-0.71
33.	N-trans-feruloyloctopamine	71.71	-0.22	95.75	-0.94
34.	Zerumin B	94.80	1.02	94.35	0.40
35.	demethoxycurcumin	91.39	1.02	100.01	-0.33
36.	Lupiwighteone	91.89	1.11	97.36	-0.95
37.	Curcumin	82.1	-0.09	99.79	-0.56
38.	Acoradin	97.78	1.00	83.67	-0.88
39.	Gitogenin	96.10	1.27	97.04	0.08
40.	B-chlorogenin	96.82	1.26	95.29	0.004
41.	Agigenin	98.73	0.97	92.26	-0.66

Pada parameter HIA berdasarkan Tabel 4.3 didapatkan 39 senyawa dengan nilai HIA yang berada dalam rentang 70 – 100% dan 2 senyawa dengan nilai HIA < 70%. Senyawa dengan nilai HIA tertinggi adalah 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone (100%), sedangkan senyawa dengan nilai HIA terendah adalah catechin (68.82%). Senyawa dengan nilai HIA yang berada dalam rentang 70 – 100% diprediksi dapat dengan baik terabsorbsi dalam usus, sedangkan senyawa dengan nilai HIA < 70% masuk dalam kategori cukup atau sedang. Hal ini sesuai dengan Sagitasa *et al* (2021) bahwa nilai HIA merupakan parameter yang dapat memprediksi penyerapan zat aktif pada usus manusia. Suatu senyawa dikategorikan dapat diabsorbsi dengan baik pada nilai rentang 70 – 100%, cukup pada rentang 20 – 70%, dan buruk pada rentang 0 – 20%.

Pada parameter permease sel CaCo-2 berdasarkan Tabel 4.3 didapatkan 31 senyawa yang memiliki nilai sel CaCo-2 > 0.9 dan 10 senyawa dengan nilai sel CaCo-2 < 0.9. Senyawa yang memiliki nilai sel CaCo-2 tertinggi adalah Beta-

asarone (1.91) dan senyawa dengan nilai sel CaCo-2 terendah adalah Catechin (-0.28). Senyawa dengan nilai sel CaCo-2 > 0.9 menunjukkan kemampuan permeabilitas yang tinggi dalam menembus membrane sel, sedangkan senyawa dengan nilai sel CaCo-2 < 0.9 menunjukkan kemampuan yang rendah. Hal ini sesuai dengan Abdullah *et al* (2021) bahwa sel CaCo-2 digunakan sebagai model *in vitro* dari mukosa usus manusia untuk memprediksi penyerapan obat yang diberikan secara oral. Sel ini berdiferensiasi membentuk lapisan monolayer pada sel epitel yang menyediakan barrier fisika dan biokimia untuk lewatnya ion dan molekul kecil. Senyawa dikatakan memiliki permeabilitas CaCo2 yang tinggi jika memiliki nilai prediksi > 0.90 .

Pada parameter PBB atau *Plasma Protein Binding* berdasarkan Tabel 4.3 didapatkan 23 senyawa yang memiliki nilai PPB $> 90\%$ dan 18 senyawa memiliki nilai PPB $< 90\%$. Senyawa dengan nilai PPB tertinggi adalah 1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one (100.32%) dan senyawa dengan nilai PPB terendah adalah 1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one (60.51%). Senyawa dengan nilai PPB $> 90\%$ diprediksi memiliki ikatan yang kuat pada protein plasma, sedangkan senyawa dengan nilai PPB $< 90\%$ memiliki ikatan yang lemah. Hal ini sesuai dengan Hartanti *et al* (2022) bahwa nilai *Plasma Protein Binding* (PPB) mempengaruhi sifat farmakokinetik dan farmakodinamik obat. Nilai PPB $> 90\%$ menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat berikatan kuat dengan protein plasma sedangkan nilai PPB $< 90\%$ menandakan bahwa senyawa tersebut terikat lemah dengan protein plasma.

Pada parameter BBB atau *Blood Brain Barrier* berdasarkan Tabel 4.3 didapatkan 11 senyawa dengan nilai BBB > 0.3 , 26 senyawa dengan rentang nilai

BBB $-1 - 0.3$, dan 4 senyawa dengan nilai BBB < -1 . Senyawa yang memiliki nilai BBB tertinggi adalah Diallyl disulfide (0.78) dan senyawa dengan nilai BBB terendah adalah Quercetin (-1.09). Senyawa dengan nilai BBB > 0.3 diprediksi mudah terdistribusi ke otak dan senyawa dengan nilai BBB < -1 diprediksi tidak terdistribusi dengan baik ke otak. Hal ini sesuai dengan Apriali *et al* (2022) bahwa nilai BBB menunjukkan konsentrasi suatu obat di otak. Parameter ini digunakan untuk mengetahui kemampuan obat menembus sawar darah otak. Pada model prediktif pkCSM, terdapat dua kategori nilai BBB, yakni nilai BBB > 0.3 dianggap mudah melewati sawar darah otak dan nilai BBB < -1 dianggap tidak dapat berdistribusi dengan baik ke otak.

Parameter yang digunakan pada prediksi metabolisme meliputi CYP2D6 substrat, CYP3A4 substrat, CYP1A2 inhibitor, CYP2C19 inhibitor, CYP2C9 inhibitor, dan CYP3A4 inhibitor. Hasil prediksi analisis metabolisme dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil analisis metabolisme

No.	Senyawa	Substrat CYP		Inhibitor CYP				
		2D6	3A4	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4
1.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	x	x	x	x	x	x	x
2.	Diallyl disulfide	x	x	x	x	x	x	x
3.	camphor	x	x	x	x	x	x	x
4.	Dipropyl disulfide	x	x	x	x	x	x	x
5.	p-coumaric acid	x	x	x	x	x	x	x
6.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	x	x	x	x	x	x	x
7.	methylisoeugenol	x	x	√	x	x	x	x
8.	Caffeic acid	x	x	x	x	x	x	x
9.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	x	x	x	x	x	x	x
10.	Ferulic acid	x	x	x	x	x	x	x
11.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	x	x	√	x	x	x	x
12.	isoasarone	x	x	√	x	x	x	x
13.	Beta-asarone	x	x	√	x	x	x	x

No.	Senyawa	Substrat CYP		Inhibitor CYP				
		2D6	3A4	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4
14.	Acolamone	x	x	√	x	x	x	x
15.	Isoshyobunone	x	x	x	√	x	x	x
16.	Shyobunon	x	x	x	x	x	x	x
17.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	x	x	√	x	x	x	x
18.	Isoacoramone	x	x	√	x	x	x	x
19.	Sinapic acid	x	x	x	x	x	x	x
20.	Calamendiol	x	x	x	x	x	x	x
21.	Acoric acid	x	x	x	x	x	x	x
22.	Galangin	x	x	√	√	√	x	x
23.	Apigenin	x	x	√	√	x	x	x
24.	Naringenin	x	x	√	x	x	x	x
25.	Kaempferol	x	x	√	x	x	x	x
26.	Fisetin	x	x	√	x	√	x	x
27.	Catechin	x	x	x	x	x	x	x
28.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	x	√	√	√	√	x	x
29.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	x	x	√	x	x	x	x
30.	Quercetin	x	x	√	x	x	x	x
31.	Bis-demethoxycurcumin	x	√	√	√	√	x	√
32.	N-cis-feruloyltyramine	x	√	√	√	x	x	√
33.	N-trans-feruloyloctopamine	x	√	x	x	x	x	√
34.	Zerumin B	x	√	x	x	x	x	x
35.	demethoxycurcumin	x	√	√	√	√	x	√
36.	Lupiwighteone	x	√	√	√	√	x	√
37.	Curcumin	x	√	√	√	√	x	√
38.	Acoradin	x	√	x	√	√	x	√
39.	Gitogenin	x	√	x	x	x	x	x
40.	B-chlorogenin	x	√	x	x	x	x	x
41.	Agigenin	x	√	x	x	x	x	x

Keterangan: x = tidak, √ = ya

Berdasarkan Tabel 4.4, terdapat 12 senyawa yang dapat dimetabolisme oleh CYP450 melalui substrat CYP3A4 dan 23 senyawa menekan aktivitas metabolisme CYP450 melalui inhibitor CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, dan CYP3A4. Hal ini sesuai dengan Krihariyani *et al* (2020) bahwa sitokrom P450

merupakan ezim penting dalam tubuh dan umumnya terdapat dalam hati. Sitokrom P450 akan mengoksidasi xenobiotik untuk merubah senyawa obat menjadi nonaktif, Sitokrom P450 bekerja dengan cara mengoksidasi senyawa organik asing, termasuk obat, dan memfasilitasi sekresi senyawa tersebut. Inhibitor enzim ini dapat mempengaruhi metabolisme obat yang bekerja secara antagonis terhadap enzim sitokrom P450, sehingga perlu dilakukan analisis untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa dalam menghambat sitokrom P450. Abdullah *et al* (2021) menambahkan bahwa sitokrom memiliki beberapa model isoform yang berbentuk CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4. Senyawa yang menjadi substrat menandakan bahwa senyawa tersebut dapat dimetabolisme oleh sitokrom P450 sedangkan senyawa yang dapat menjadi inhibitor menandakan bahwa senyawa tersebut dapat menekan aktivitas metabolisme sitokrom P450.

Parameter yang digunakan pada prediksi ekskresi meliputi total clearance dan renal OCT2 substrat. Parameter yang digunakan pada analisis toksisitas meliputi uji AMES dan hepatotoksitas. Hasil prediksi analisis ekskresi dan toksisitas dapat dilihat pada Tabel 4.5

Tabel 4.5 Hasil analisis ekskresi dan toksisitas

No.	Senyawa	Ekskresi		Toksitas	
		Total Clearance	Renal OCT2 Substrat	Uji AMES	Hepato toxicity
1.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	0.467	Tidak	Tidak	Tidak
2.	Diallyl disulfide	0.547	Tidak	Tidak	Tidak
3.	camphor	0.109	Tidak	Tidak	Tidak
4.	Dipropyl disulfide	0.429	Tidak	Tidak	Tidak
5.	p-coumaric acid	0.662	Tidak	Tidak	Tidak
6.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	0.621	Tidak	Tidak	Tidak
7.	methylisoeugenol	0.273	Tidak	Tidak	Tidak
8.	Caffeic acid	0.508	Tidak	Tidak	Tidak

No.	Senyawa	Ekskresi		Toksisitas	
		Total Clearance	Renal OCT2 Substrat	Uji AMES	Hepato toxicity
9.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	0.404	Tidak	Tidak	Tidak
10.	Ferulic acid	0.623	Tidak	Tidak	Tidak
11.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	0.694	Tidak	Tidak	Tidak
12.	isoasarone	0.503	Tidak	Tidak	Tidak
13.	Beta-asarone	0.441	Tidak	Tidak	Tidak
14.	Acolamone	1.111	Tidak	Tidak	Tidak
15.	Isoshyobunone	1.345	Tidak	Tidak	Tidak
16.	Shyobunon	0.324	Tidak	Tidak	Tidak
17.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	0.806	Tidak	Tidak	Tidak
18.	Isoacoramone	0.445	Tidak	Tidak	Tidak
19.	Sinapic acid	0.718	Tidak	Tidak	Tidak
20.	Calamendiol	1.104	Tidak	Tidak	Tidak
21.	Acoric acid	1.28	Tidak	Tidak	Tidak
22.	Galangin	0.256	Tidak	Tidak	Tidak
23.	Apigenin	0.566	Tidak	Tidak	Tidak
24.	Naringenin	0.06	Tidak	Tidak	Tidak
25.	Kaempferol	0.477	Tidak	Tidak	Tidak
26.	Fisetin	0.421	Tidak	Tidak	Tidak
27.	Catechin	0.183	Tidak	Tidak	Tidak
28.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	0.066	Tidak	Tidak	Tidak
29.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	0.207	Tidak	Tidak	Tidak
30.	Quercetin	0.407	Tidak	Tidak	Tidak
31.	Bis-demethoxycurcumin	-0.008	Tidak	Tidak	Tidak
32.	N-cis-feruloyltyramine	0.27	Tidak	Tidak	Ya
33.	N-trans-feruloyloctopamine	0.218	Tidak	Tidak	Ya
34.	Zerumin B	0.847	Tidak	Tidak	Ya
35.	demethoxycurcumin	0.026	Tidak	Tidak	Tidak
36.	Lupiwighteone	0.294	Tidak	Tidak	Tidak
37.	Curcumin	-0.002	Tidak	Tidak	Tidak
38.	Acoradin	0.348	Tidak	Tidak	Tidak
39.	Gitogenin	0.342	Tidak	Tidak	Tidak
40.	B-chlorogenin	0.346	Ya	Tidak	Tidak
41.	Agigenin	0.367	Ya	Tidak	Tidak

Pada parameter Total Clearance, berdasarkan Tabel 4.5 senyawa yang memiliki nilai total clearance terbesar adalah Zerumin B (0.84) dan senyawa dengan nilai total clearance terkecil adalah Bis-demethoxycurcumin (-0.008). Hal ini sesuai dengan Krihariyani *et al* (2020) bahwa untuk memprediksi proses ekskresi suatu senyawa dapat dilakukan dengan mengukur Total Clearance (CLTOT). CLTOT merupakan kombinasi dari *hepatic clearance* (metabolisme di hati dan empedu) dan *renal clearance* (ekskresi melalui ginjal). Hal ini juga berkaitan dengan bioavailabilitas. Semakin besar nilai total clearance, semakin cepat senyawa tersebut diekskresikan dari tubuh. Begitupun sebaliknya, semakin kecil nilai total clearance, maka semakin lambat senyawa tersebut diekskresikan dari tubuh.

Pada parameter Renal OCT2 substrat, berdasarkan Tabel 4.5 didapatkan 39 senyawa bukan merupakan substrat OCT2 dan 2 senyawa merupakan substrat OCT2. Menurut Abdullah *et al* (2021), OCT2 atau *organic cation transporter 2* merupakan transporter uptake ginjal yang berperan penting dalam perpindahan dan clearance obat dan senyawa endogen di ginjal. Analisis senyawa potensial untuk ditransport oleh OCT2 dapat memberikan informasi mengenai clearance dan adanya potensi kontraindikasi. Hal ini dikarenakan substrat OCT2 memiliki potensi interaksi yang merugikan jika diberikan bersama dengan inhibitor OCT2.

Pada analisis toksisitas berdasarkan Tabel 4.5 pada uji AMES menunjukkan bahwa semua senyawa tidak berpotensi mutagen ataupun karsinogen. Hal ini sesuai dengan Apriali *et al* (2022) bahwa uji AMES banyak digunakan untuk menilai potensi mutagenic suatu senyawa menggunakan bakteri. Hasil positif menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat mutagenik dan dapat bertindak

sebagai karsinogen. Berdasarkan Tabel 4.5 pada uji hepatotoksisitas terdapat 3 senyawa yang berpotensi menjadi toksik pada hati, yaitu N-cis-feruloyltyramine, N-trans-feruloyloctopamine, dan Zerumin B. Menurut Juliarta *et al* (2018), hepatotoksisitas merupakan keadaan di mana sel-sel hati mengalami kerusakan akibat senyawa-senyawa kimia yang bersifat toksik.

4.1.4 Studi Molecular Docking

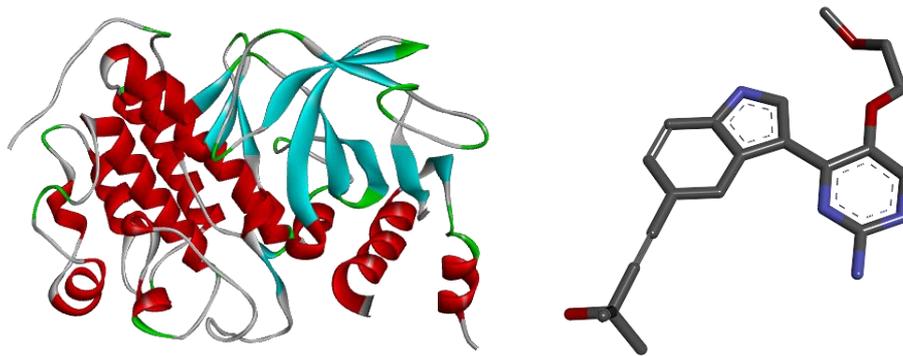
Makromolekul yang digunakan pada studi molecular docking penelitian ini adalah NFkB atau *Nuclear Factor kappa B* dan COX-2 atau siklooksigenase-2. Struktur tiga dimensi NFkB dan COX-2 diunduh dari situs PDB Database (<http://www.rscb.org>). Makromolekul ini dipilih untuk melihat kemampuan senyawa uji terhadap NFkB dan COX-2 yang merupakan reseptor inflamasi. Identitas makromolekul yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Identitas makromolekul yang digunakan

No.	Nama Reseptor	PDB ID	Resolutions	Chains	Native Ligand
1.	NFkB	4IDV	2.90 Å	A, B, C, D	4-{3-[2-amino-5-(2-methoxyethoxy)pyrimidin-4-yl]-1H-indol-5-yl}-2-methylbut-3-yn-2-ol
2.	COX-2	3LN1	2.40 Å	A, B, C, D	4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide

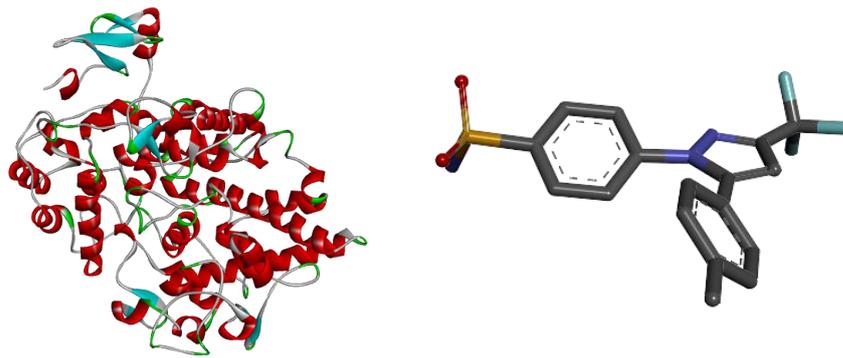
Makromolekul NFkB dengan PDB ID 4IDV ini dipilih karena memiliki nilai resolusi dan nilai validasi yang baik serta tidak memiliki mutasi. NFkB juga merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam proses terjadinya inflamasi. Hal ini sesuai dengan Hadi *et al* (2021) bahwa NFkB merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen yang penting untuk respon imun bawaan dan adaptif.

Aktivasi NFkB berperan dalam respon pertahanan, proliferasi limfosit, dan inflamasi. yang bergantung pada NIK (NFkB-inducing Kinase) dalam memperoleh sinyal aktivitas biologis. Makromolekul NFkB dan native ligand yang telah dipreparasi menggunakan aplikasi Pymol dapat dilihat pada Gambar 4.1.



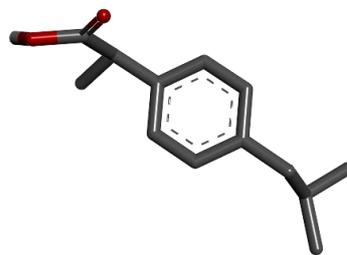
Gambar 4.1 Makromolekul NFkB dan native ligandnya

Makromolekul COX-2 dengan PDB ID 3LN1 ini dipilih karena pada penelitian Prato (2012) sebelumnya, dilakukan pemilihan reseptor COX-2 dengan melakukan docking pada ligan asli untuk menentukan nilai RMSD yang digunakan untuk melihat validasi docking. Dari 19 reseptor, didapatkan hasil yang terbaik adalah 3LN1 dilihat dari nilai RMSD yang valid dan memiliki nilai paling kecil diantara reseptor yang lain. Sehingga makromolekul COX-2 dengan PDB ID 3LN1 memenuhi syarat untuk dilakukan molecular docking bagi senyawa uji dalam penelitian ini. Makromolekul COX-2 dan native ligand yang telah dipreparasi menggunakan aplikasi Pymol dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Makromolekul COX-2 dan native ligandnya

Senyawa obat yang digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini adalah obat ibuprofen. Ibuprofen merupakan obat antiinflamasi non steroid (AINS) turunan asam propionat. Obat ini dapat meredakan rasa sakit ringan hingga menengah, serta mengurangi peradangan. Ibuprofen merupakan obat yang antiinflamasi yang baik dan banyak digunakan di masyarakat sehingga dapat digunakan sebagai pembanding (Ruslin *et al*, 2020). Ibuprofen bekerja dengan cara menghambat enzim siklooksigenase pada biosintesis prostaglandin, sehingga konversi asam arakidonat menjadi PG-G2 terganggu (Mediansyah & Soraya, 2017). Senyawa obat ibuprofen yang telah dipreparasi menggunakan aplikasi Pymol dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Senyawa Obat Ibuprofen

Selanjutnya dilakukan validasi metode yang dilakukan dengan cara melakukan *redocking* pada native ligand yang terdapat pada makromolekul. Validasi dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Pyrx* dan *Discovery Studio*

Visualizer 2019 serta parameter RMSD. Nilai RMSD digunakan untuk mengetahui apakah makromolekul yang dipilih dapat digunakan untuk uji *in silico* atau tidak. Hal ini sesuai dengan Sagitasa *et al* (2021) bahwa validasi metode dilakukan untuk menilai parameter-parameter tertentu dalam suatu penelitian. Parameter tersebut harus memenuhi persyaratan agar dapat diaplikasikan. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) akan menyatakan besarnya perubahan interaksi protein-ligan pada struktur makromolekul sebelum dan sesudah dilakukan penambatan. Suatu makromolekul dinyatakan valid jika memiliki nilai RMSD sebesar $\leq 2 \text{ \AA}$. Hasil analisis validasi metode docking dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil validasi metode

No.	Nama Reseptor	Grid Box (x,y,z)	Validasi		Energi Ikatan (kcal/mol)
			Nilai RMSD	Referensi RMSD	
1.	NFkB (4IDV)	16.0903, 13.8912, 87.1400	0.335	$\leq 2 \text{ \AA}$	-9.3
2.	COX-2 (3LN1)	30.3211, -23.6966, -16.5623	0.387	$\leq 2 \text{ \AA}$	-12.4

Setelah dilakukan validasi metode docking, selanjutnya dilakukan *molecular docking* untuk memprediksi interaksi antara senyawa uji dengan bagian aktif reseptor NFkB dan COX-2. Uji *molecular docking* menggunakan aplikasi *Pyrx* dan *Discovery Studio Visualizer 2019*. Terdapat beberapa parameter yang didapatkan dari analisis docking ini, yaitu nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan jenis interaksi yang terjadi pada ligand dan reseptor. Interaksi tersebut diprediksi melalui ikatan hidrogen. Nilai energi ikatan yang semakin kecil menandakan semakin stabil interaksi yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan Hartanti *et al* (2022) bahwa energi ikatan merupakan hasil kalkulasi atau *scoring function* dari

konformasi ligan pada makromolekul dalam kondisi ekuilibrium. Energi ikatan menunjukkan besarnya afinitas antara senyawa uji dengan reseptor makromolekul. Semakin rendah nilai energi ikatan menunjukkan ikatan antara protein dan ligan yang dihasilkan semakin stabil.

4.1.4.1 Penambatan Molekuler Senyawa Uji dengan Reseptor NFκB

Hasil analisis penambatan molekuler senyawa uji dengan reseptor NFκB menggunakan aplikasi Pyrx dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Hasil analisis *molecular docking* senyawa uji dengan reseptor NFκB

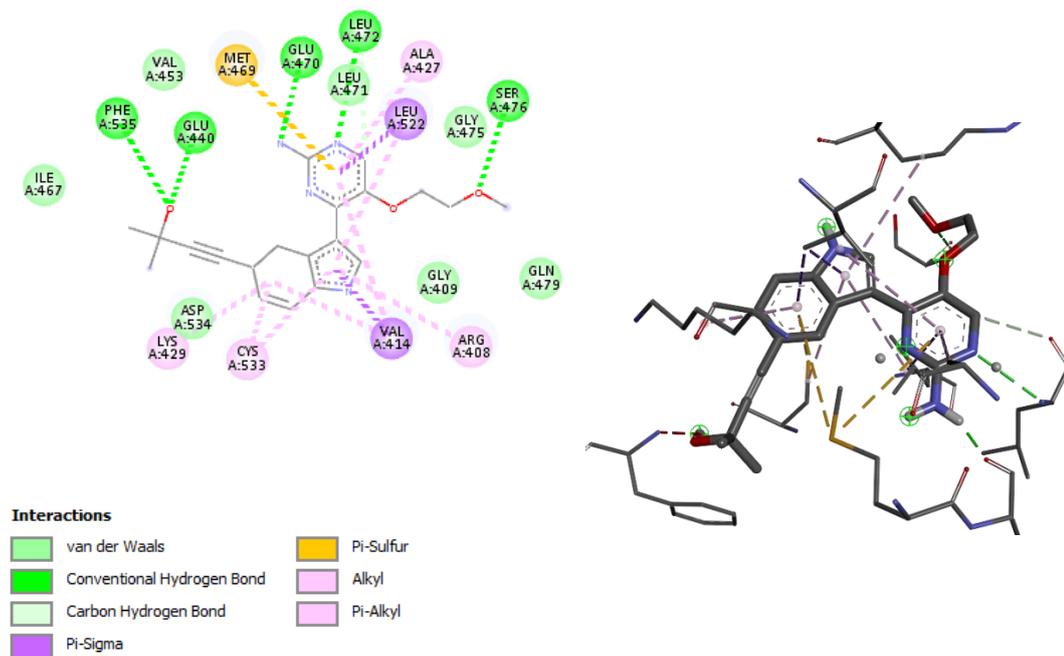
No.	Senyawa / Ligan Uji	Energi Ikatan (kkal/mol)	Ikatan Hidrogen
	Native Ligand 4-{3-[2-amino-5-(2-methoxyethoxy)pyrimidin-4-yl]-1H-indol-5-yl}-2-methylbut-3-yn-2-ol	-9.3	PHE A:535, GLU A:440, GLU A:470, LEU A:472, SER A:476
	Senyawa Pembanding Ibuprofen (2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid)	-7.1	ASP A:519
1.	Lupiwighteone	-9.3	GLU A:440, GLN A:479
2.	Apigenin	-9.1	SER A:410, ASN A:520
3.	Naringenin	-9.0	LEU A:472, ASP A:534, SER A:410, ASN A:520
4.	Fisetin	-9.0	GLY A:475, SER A:410, ASN A:520
5.	Quercetin	-9.0	LEU A:472, SER A:410
6.	Kaempferol	-8.9	LEU A:472, ASP A:534, SER A:410
7.	Catechin	-8.9	SER A:410, ASN A:520
8.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	-8.7	ASP A:534, SER A:410
9.	Galangin	-8.6	-
10.	N-trans-feruloyloctopamine	-8.6	SER A:410
11.	N-cis-feruloyltyramine	-8.5	-
12.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	-8.4	LEU A:472, CYS A:444
13.	demethoxycurcumin	-8.2	LEU A:472
14.	Bis-demethoxycurcumin	-8.1	ASP A:534, GLU A:413
15.	Curcumin	-8.1	SER A:476

16.	Zerumin B	-7.8	ASP A:534
17.	Acolamone	-7.5	-
18.	Sinapic acid	-7.2	ASP A:534, LEU A:472
19.	Calamendiol	-7.1	-
20.	Acoric acid	-7.0	VAL A:414, ARG A:416
21.	Ferulic acid	-6.9	ASP A:534, LEU A:472
22.	Caffeic acid	-6.7	LEU A:472, ASP A:534
23.	Shyobunon	-6.7	-
24.	Isoshyobunone	-6.6	-
25.	p-coumaric acid	-6.4	LEU A:472, ASP A:534
26.	Beta-asarone	-6.4	GLY A: 409
27.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	-6.4	GLY A:409, ARG A:408
28.	Isoacoramone	-6.4	CYS A:533
29.	methylisoeugenol	-6.3	-
30.	isoasarone	-6.2	-
31.	Acoradin	-6.2	ARG A:416
32.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	-6.1	LEU A:472
33.	Camphor	-5.6	LEU A:472
34.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	-5.5	GLY A:409
35.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	-4.2	-
36.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	-4.0	-
37.	Dipropyl disulfide	-3.7	LEU A:472
38.	Diallyl disulfide	-3.6	-
39.	B-chlorogenin	3.5	GLN A:479, LEU A:472
40.	Gitogenin	4.9	-
41.	Agigenin	7.3	-

Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa nilai energi bebas ikatan antara senyawa native ligand dengan reseptor NFkB adalah -9.3 kkal/mol. Berdasarkan Tabel 4.8, nilai energi bebas ikatan terkecil dari interaksi antara senyawa uji dari kombinasi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan reseptor NFkB, adalah -9.3 kkal/mol dari senyawa lupiwighteone. Nilai tersebut sama dengan nilai energi bebas ikatan antara native ligand dengan reseptor NFkB dan lebih kecil dari nilai energi bebas ikatan antara senyawa obat ibuprofen dengan reseptor NFkB. Hal ini menunjukkan bahwa lupiwighteone

memiliki potensi sebagai antiinflamasi melalui penghambatan NFkB secara molekuler.

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara native ligand dengan reseptor NFkB dapat dilihat pada Gambar 4.4.

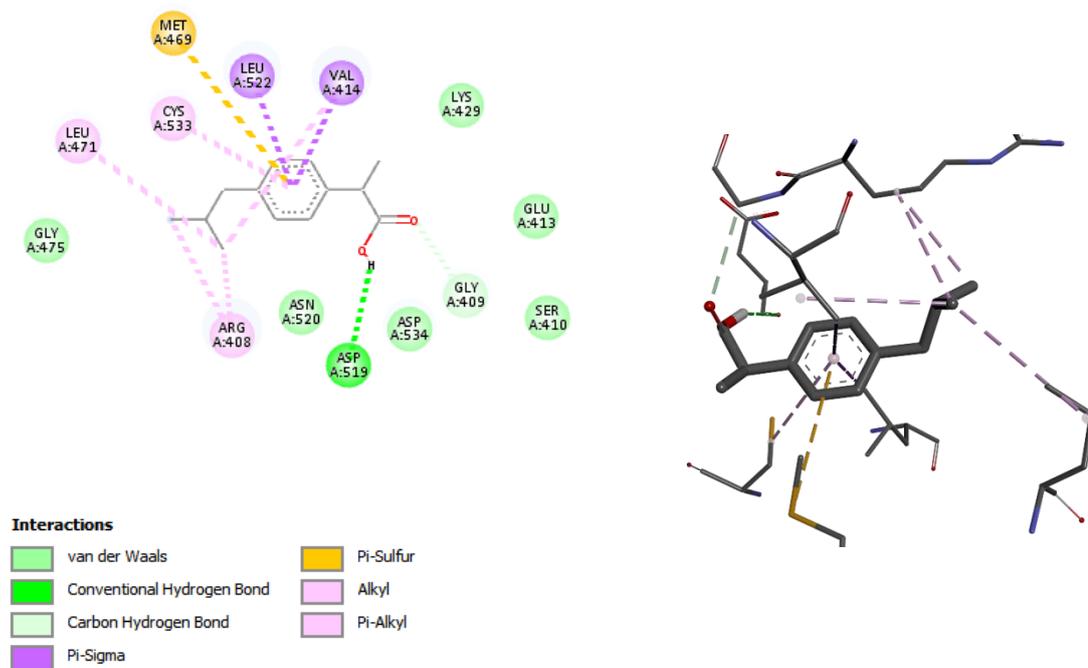


Gambar 4.4 Interaksi ikatan dan residu asam amino native ligand dengan reseptor NFkB bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa native ligand dengan reseptor NFkB memiliki ikatan hidrogen, van der waals, carbon hydrogen bond, Pi-sigma, Pi-sulfur, Pi-alkyl, dan alkyl. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu PHE A:535, GLU A:440, GLU A:470, LEU A:472, SER A:476. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu VAL A:453, LEU A:471, GLY A:475. Ikatan carbon hydrogen bond terbentuk pada asam amino residu GLN A:479, GLY A:409, ASP A:534, ILE A:467. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu LEU A:522, VAL A:414. Ikatan Pi-sulfur terbentuk pada asam amino residu MET A:469. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu ALA

A:427. Ikatan alkyl terbentuk pada asam amino residu LYS A:429, CYS A:5333, ARG A:408.

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara senyawa obat ibuprofen dengan reseptor NF κ B dapat dilihat pada Gambar 4.5

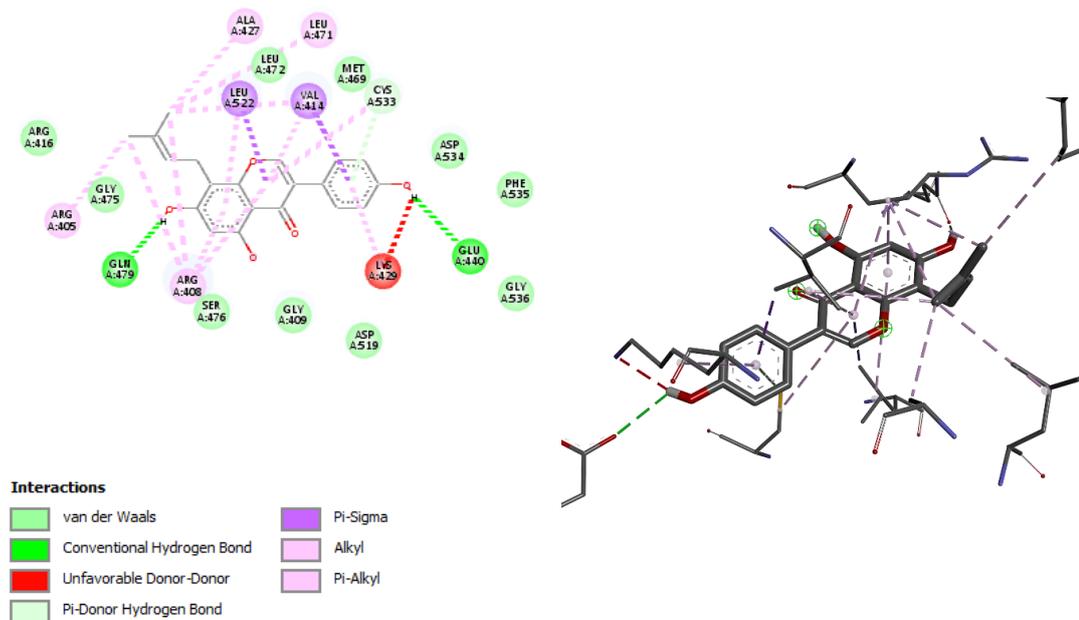


Gambar 4.5 Interaksi ikatan dan residu asam amino ibuprofen dengan reseptor NF κ B bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa ibuprofen dengan reseptor NF κ B memiliki ikatan hidrogen, van der waals, carbon hydrogen bond, Pi-sigma, Pi-sulfur, Pi-alkyl, dan alkyl. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu ASP A:519. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu GLY A:475, LYS A:429, GLU A:413, SER A:410, ASP A:534, ASN A:520. Ikatan carbon hydrogen bond terbentuk pada asam amino residu GLY A:409. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu LEU A:522, VAL A:414. Ikatan Pi-sulfur terbentuk pada asam amino residu MET A:469. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada

asam amino residu LEU A:471. Ikatan alkyl terbentuk pada asam amino residu CYS A:533, ARG A:408.

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara senyawa Lupiwighteone dengan reseptor NFkB dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Interaksi ikatan dan residu asam amino senyawa lupiwighteone dengan reseptor NFkB bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa lupiwighteone dengan reseptor NFkB memiliki ikatan hidrogen, van der waals, Pi-donor hydrogen bond, Pi-sigma, Pi-alkyl, alkyl, dan unfavorable donor-donor. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu GLU A:440, GLN A:479. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu ARG A:416, GLY A:475, SER A:476, GLY A:409, ASP A:519, GLY A:536, PHE A:535, ASP A:534, MET A:469, LEU A:472. Ikatan Pi-donor hydrogen bond terbentuk pada asam amino residu CYS A:533. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu LEU A:522, VAL A:414. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu ALA A:427, LEU A:471. Ikatan alkyl

terbentuk pada asam amino residu ARG A:405, ARG A:408. Ikatan unfavorable donor-donor terbentuk pada asam amino LYS A:429.

Berdasarkan Gambar 4.4 dan Gambar 4.6 dapat dilihat bahwa senyawa lupiwighteone berinteraksi dengan NFkB melalui ikatan hidrogen yang sama dengan yang terjadi antara native ligand dengan NFkB, yaitu GLU A:440. Selain itu, senyawa lupiwighteone memiliki kemiripan interaksi residu asam amino dengan native ligand pada GLY A:475, LEU A:522, VAL A:414, ALA A:427, dan ARG A:408. Berdasarkan Gambar 4.5 dan Gambar 4.6 dapat dilihat bahwa senyawa lupiwighteone berinteraksi dengan NFkB memiliki kemiripan residu asam amino dengan senyawa ibuprofen pada GLY A:475, ASP A:534, LEU A:522, VAL A:414, ARG A:408. Hal tersebut menandakan bahwa tempat sisi aktif senyawa lupiwighteone dengan native ligand dan senyawa ibuprofen berikatan dengan NFkB sudah sama dan banyaknya kemiripan residu asam amino yang terbentuk menunjukkan bahwa ikatan lupiwighteone hampir sekuat ligan alami dan senyawa ibuprofen. Oleh karena itu, diharapkan senyawa lupiwighteone akan memberikan afinitas yang sama dalam menghambat kerja NFkB.

Senyawa lupiwighteone memiliki potensi sebagai antiinflamasi pada reseptor NFkB karena memiliki afinitas dengan reseptor NFkB tersebut dengan nilai ikatan sebesar -9.3 kkal/mol serta berinteraksi melalui ikatan hidrogen diantaranya pada asam amino GLU A:440. Di samping itu hasil uji prediksi farmakokinetik dan toksisitas lupiwighteone menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki profil farmakokinetika yang baik, yaitu HIA (91,89%), Sel CaCo2 (1.11×10^{-6} cm/s), PPB (97.36%), BBB (-0.95), dapat dimetabolisme oleh sitokrom P450, total

clearane (0.29), bukan merupakan substrat OCT2, serta tidak memiliki toksisitas pada hati dan uji AMES.

Prediksi ini sesuai dengan Tsalissavrina *et al* (2022) bahwa senyawa lupiwighteone termasuk dalam senyawa isoflavon. Isoflavon merupakan senyawa polifenol golongan flavonoid dan terdapat pada tanaman. Beberapa efek bioaktif isoflavon diantaranya sebagai antivirus, antiinflamasi, kardioprotektif, antidiabetes, atikanker, anti penuaan, dan antioksidan. Secara lebih lanjut Yu *et al* (2016) menjelaskan tentang mekanisme antiinflamasi dalam isoflavon. Setelah stimulasi NFkB diaktifkan oleh IB kinase (IKK). Kemudian NFkB bebas bertranslokasi ke dalam nucleus dan mengaktifkan transkripsi gen target termasuk sitokin dan kemokin pro-inflamasi, nitrat yang dapat diinduksi oksida sintase (iNOS), dan siklooksigenase 2 (COX-2). Isoflavon menurunkan produksi contributor pro-inflamasi dengan menghambat sistem transkripsi NFkB. Isoflavon juga memodulasi metabolisme asam arakidonat (AA) dan produksi NO dengan menghambat kadar protein dan aktivitas enzim pro-inflamasi seperti fosfolipase A2 (PLA2), lipoksigenase (LOX), COX-2, dan iNOS.

4.1.4.2 Penambatan Molekuler Senyawa Uji dengan Reseptor COX-2

Hasil analisis penambatan molekuler senyawa uji dengan reseptor COX-2 menggunakan aplikasi Pyrx dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil analisis *molecular docking* senyawa uji dengan reseptor COX-2

No.	Senyawa / Ligan Uji	Energi Ikatan (kkal/mol)	Ikatan Hidrogen
	Native Ligand 4-{3-[2-amino-5-(2-methoxyethoxy)pyrimidin-4-yl]-1H-indol-5-yl}-2-methylbut-3-yn-2-ol	-12.4	ARG A:106, SER A:339, LEU A:338, GLN A:178, ARG A:499
	Senyawa Pembanding	-7.7	TYR A:341, ARG A:499,

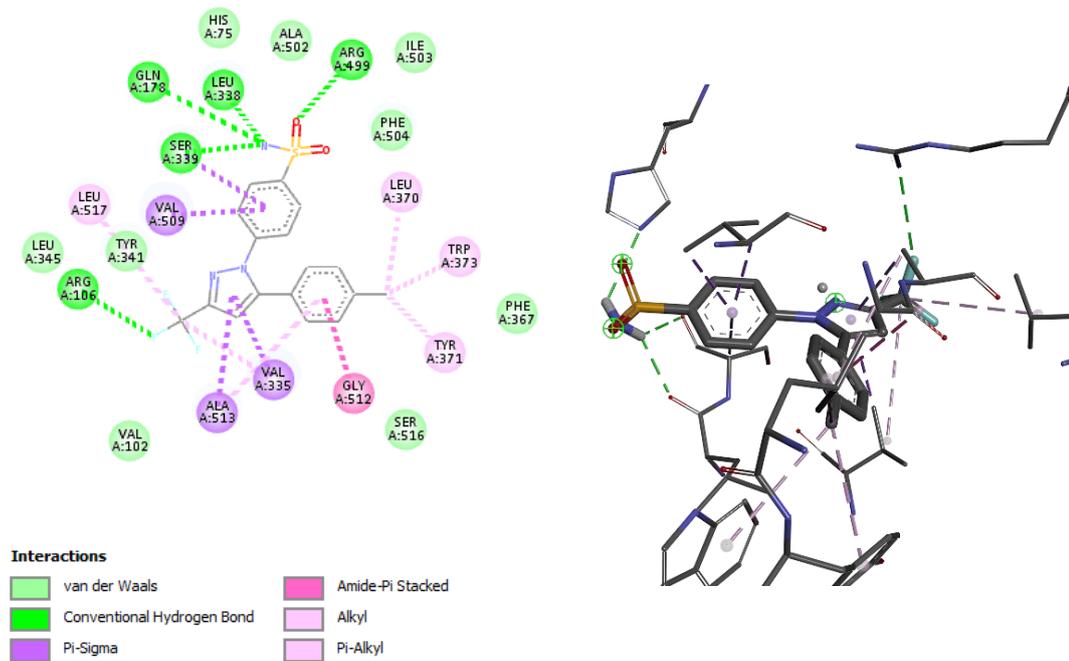
	Ibuprofen (2-[4-(2-methylpropyl) phenyl]propanoic acid)		HIS A: 75
1.	Apigenin	-9.8	TYR A:341
2.	Fisetin	-9.8	TYR A:341
3.	Catechin	-9.8	HIS A:75, SER A:516, LEU A:338, GLN A:178
4.	Lupiwighteone	-9.6	SER A:516, TYR A:341
5.	Naringenin	-9.6	TYR A:341, TYR A:371
6.	Kaempferol	-9.5	TYR A:371, TYR A:341
7.	Quercetin	-9.4	GLN A:178, TYR A:371, TYR A:341
8.	Galangin	-9.4	TYR A:341, SER A:339
9.	demethoxycurcumin	-9.4	LEU A:338, GLN A:178, TYR A:341, ARG A:106, MET A:508
10.	Bis-demethoxycurcumin	-8.9	-
11.	Acolamone	-8.8	-
12.	Curcumin	-8.6	TYR A:371
13.	N-trans-p- coumaroyloctopamine	-8.3	TYR A:371, MET A:508, HIS A:75
14.	N-cis-feruloyltyramine	-8.3	TYR A:341
15.	Acoric acid	-7.9	SER A:339, ARG A:499
16.	Calamendiol	-7.8	-
17.	Isoshyobunone	-7.8	TYR A:341
18.	Shyobunon	-7.8	-
19.	Zerumin B	-7.7	ARG A:106
20.	N-trans-feruloyloctopamine	-7.6	-
21.	Caffeic acid	-7.4	LEU A:338, GLN A:178
22.	Ferulic acid	-7.3	LEU A:338, SER A:339, ARG A:499
23.	Sinapic acid	-7.2	ARG A:499, GLN A:178
24.	p-coumaric acid	-6.9	SER A:339
25.	methylisoeugenol	-6.6	-
26.	Beta-asarone	-6.5	SER A:516
27.	Isoacoramone	-6.5	TYR A:371
28.	1-(2,4,5- trimethoxyphenyl)propan-2- one	-6.3	-
29.	isoasarone	-6.3	-
30.	camphor	-6.1	-
31.	2,4,5- trimethoxybenzaldehyde	-6.0	SER A:516, TYR A:371
32.	2,5-dimethoxy-p- benzoquinone	-5.9	TYR A:341
33.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-	-5.9	PHE A:504

	1,4,6-heptatrien-3-one		
34.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	-4.8	-
35.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	-4.7	SER A:516
36.	Diallyl disulfide	-4.2	-
37.	Dipropyl disulfide	-4.1	-
38.	Acoradin	-3.7	SER A:516
39.	B-chlorogenin	16.4	TYR A:371
40.	Gitogenin	21.0	-
41.	Agigenin	22.9	SER A:516

Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa nilai energi bebas ikatan antara senyawa native ligand dengan reseptor COX-2 adalah -12.4 kkal/mol. Berdasarkan Tabel 4.9, tidak terdapat senyawa uji yang memiliki nilai energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan native ligand. Namun, senyawa apigenin, fisetin, dan catechin memiliki nilai energi ikatan lebih rendah dibandingkan senyawa uji lainnya, yaitu dengan nilai -9.8 kkal/mol dan juga lebih rendah daripada senyawa obat ibuprofen. Hasil tersebut menunjukkan kemampuan senyawa apigenin, fisetin, dan catechin untuk berikatan dengan sisi aktif reseptor COX-2 lebih lemah dibandingkan dengan native ligand, tetapi senyawa-senyawa tersebut masih memiliki kemungkinan untuk berikatan dengan sisi aktif reseptor COX-2 dengan baik dan lebih kuat dibandingkan dengan senyawa ibuprofen.

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara native ligand dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 4.7. Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa native ligand dengan reseptor COX-2 memiliki ikatan hidrogen, ikatan van der waals, ikatan Pi-sigma, ikatan Pi-stacked, ikatan Pi-alkyl, dan ikatan alkyl. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu ARG A:106, SER A:339, LEU A:338, GLN A:178, ARG A:499. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu VAL A:102, SER A:516, PHE A:367, PHE A:504, ILE A:503, ALA A:502, HIS A:75, TYR A:341, LEU A:345. Ikatan

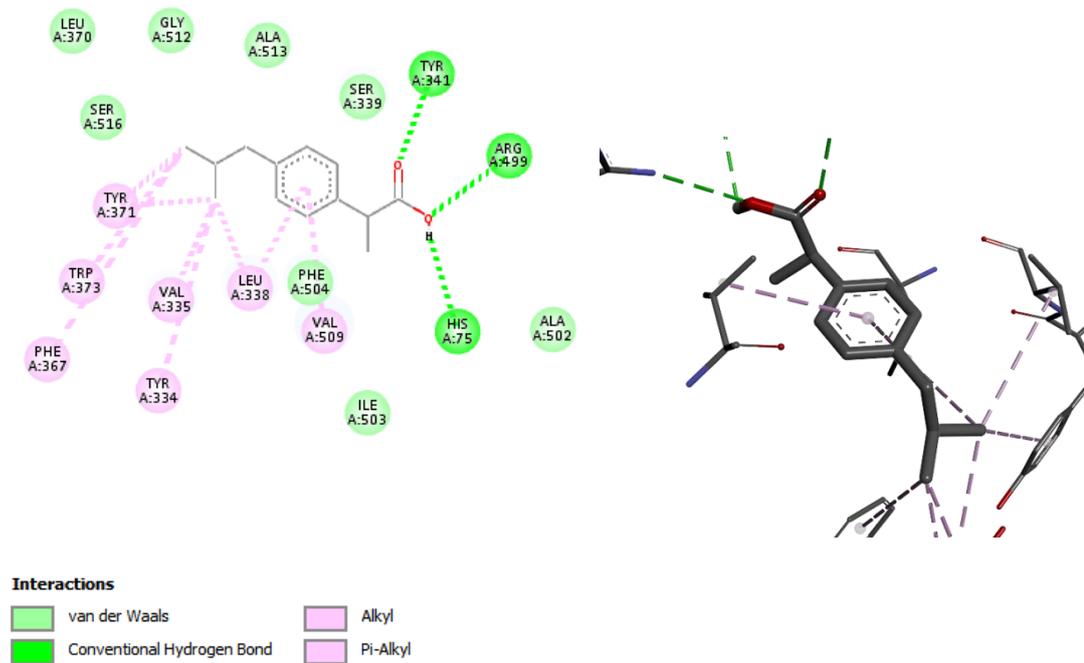
Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu VAL A:509, VAL A:335, ALA A:513. Ikatan Pi-stacked terbentuk pada asam amino residu GLY A:512. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu TRP A:373, LEU A:370. Ikatan alky terbentuk pada asam amino residu LEU A:517, TYR A:371.



Gambar 4.7 Interaksi ikatan dan residu asam amino native ligand dengan reseptor COX-2 bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

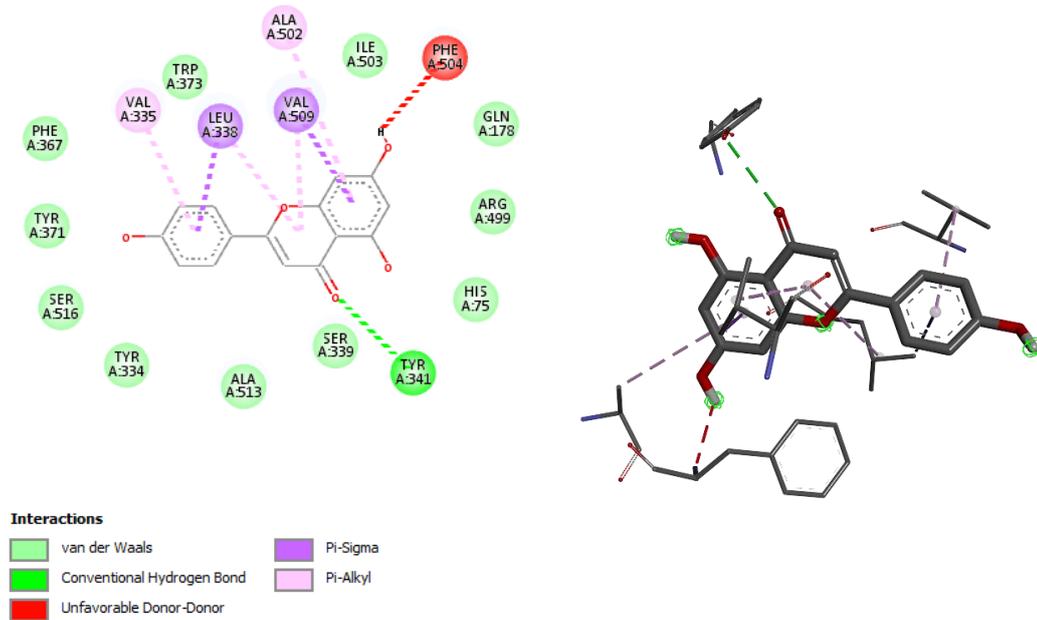
Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara senyawa ibuprofen dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 4.8. Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa ibuprofen dengan reseptor COX-2 memiliki ikatan hidrogen, ikatan van der waals, ikatan alkyl, dan ikatan Pi-alkyl. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu TYR A:341, ARG A:499, HIS A:75. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu SER A:516, LEU A:370, GLY A:512, ALA A:513, SER A:339, PHE A:504, ILE A:503, ALA A:502. Ikatan alkyl terbentuk pada asam amino residu TYR A:371, TRP A:373, PHE

A:367. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu VAL A:335, TYR A:334, LEU A:338, VAL A:509.



Gambar 4.8 Interaksi ikatan dan residu asam amino ibuprofen dengan reseptor COX-2 bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara senyawa apigenin dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 4.9. Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa apigenin dengan reseptor COX-2 memiliki ikatan hidrogen, ikatan van der waals, ikatan Pi-sigma, ikatan Pi-alkyl, dan ikatan unfavorable donor-donor. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu TYR A:341. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu SER A:339, ALA A:513, TYR A:334, SER A:516, TYR A:371, PHE A:367, TRP A:373, ILE A:503, GLN A:178, ARG A:499, HIS A:75. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu VAL A:509, LEU A:338. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu ALA A:502.VAL A:355. Ikatan unfavorable donor-donor terbentuk pada asam amino residu PHE A:504.



Gambar 4.9 Interaksi ikatan dan residu asam amino senyawa apigenin dengan reseptor COX-2 bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Berdasarkan Gambar 4.7 dan Gambar 4.9 dapat dilihat bahwa senyawa apigenin berinteraksi dengan COX-2 melalui interaksi residu asam amino yang sama dengan ligan alami pada SER A:516, PHE A:367, ILE A:503, HIS A:75, dan VAL A:509. Berdasarkan Gambar 4.8 dan Gambar 4.9 dapat dilihat bahwa interaksi senyawa apigenin dengan COX-2 memiliki interaksi ikatan hidrogen yang sama pada TYR A:341 dan kemiripan interaksi lainnya pada ILE A:503, SER A:339, ALA A:513, SER A:516, VAL A:335. Hal tersebut menunjukkan bahwa ikatan senyawa apigenin hampir sekuat ligan alami dan ibuprofen dilihat dari banyaknya kemiripan residu asam amino yang terbentuk, sehingga diharapkan senyawa apigenin akan memberikan afinitas yang sama dalam menghambat kerja COX-2.

Senyawa apigenin memiliki potensi sebagai antiinflamasi pada reseptor COX-2 karena memiliki afinitas dengan reseptor COX-2 tersebut dengan nilai ikatan sebesar -9.8 kkal/mol serta berinteraksi melalui beberapa ikatan interaksi

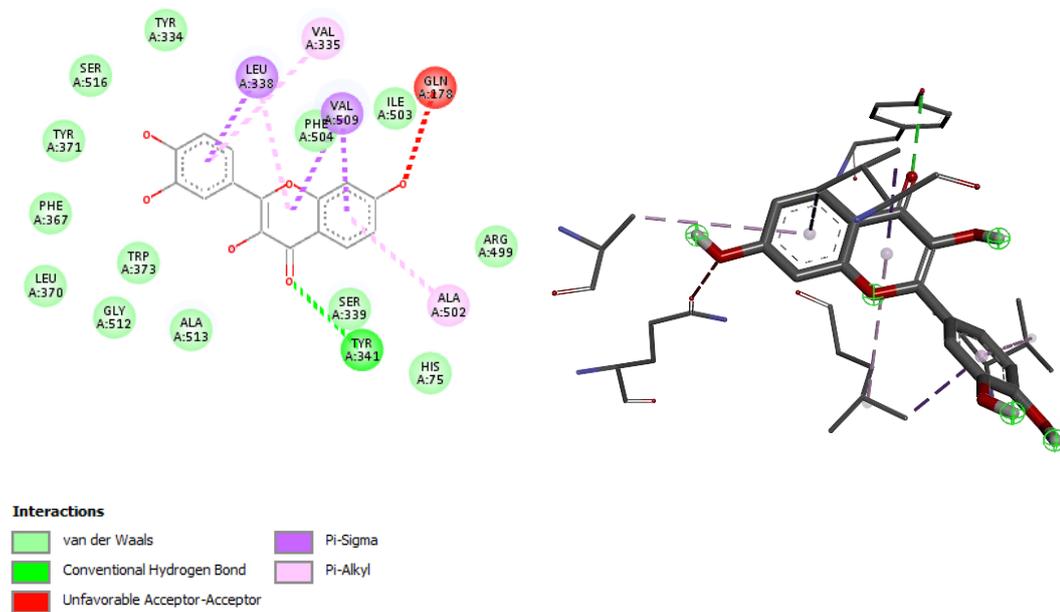
residu asam amino yang sama dengan native ligand. Di samping itu hasil uji prediksi farmakokinetik dan toksisitas apigenin menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki profil farmakokinetika yang baik, yaitu HIA (93,25%), Sel CaCo2 (1.007×10^{-6} cm/s), PPB (97.25%), BBB (-0.73), total clearance (0.56), bukan merupakan substrat OCT2, serta tidak memiliki toksisitas pada hati dan uji AMES.

Prediksi ini sesuai dengan Anuar & Jutti (2018) bahwa apigenin adalah produk alami tumbuhan yang termasuk dalam kelas flavon dan merupakan aglikon dari beberapa glikosida yang terjadi secara alami. Apigenin memiliki aktivitas inhibitor COX-2 yang kuat karena mampu menghentikan peradangan sama seperti efektifnya obat antiinflamasi lainnya. Mekanisme kerja antiinflamasi dari apigenin adalah dengan cara menghambat aktivitas collagenase yang terlibat dalam rheumatoid arthritis (RA) dan menekan produksi lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO). Apigenin juga mengurangi ekspresi cyclooxygenase-2 (COX-2) yang diinduksi LPS dan mengurangi produksi *tumor necrosis factor* alpha (TNF- α) dari monosit ke HUVEC monolayer.

Apigenin secara signifikan menekan peningkatan regulasi TNF- α stimulated dari molekul adhesi seluler vascular-1 (VCAM-1), molekul adhesi intraseluler-1 (ICAM-1), dan E-selectin-mRNA ke tingkat basal dan juga dapat menghambat IL-1 β . Secara bersama-sama, hal tersebut menunjukkan bahwa apigenin memiliki aktivitas antiinflamasi yang signifikan yang melibatkan penghambatan *NO-mediated COX-2 expression* dan *monocyte adherence*. Hal ini diperkuat oleh Sapri *et al* (2017) bahwa pada penelitian sebelumnya, dilakukan uji efek antiinflamasi apigenin pada ekspresi iNOS dan produksi NO secara *in vitro* pada sel makrofag

J774.A1 menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang bermakna pada produksi NO dengan IC₅₀ 0,08 mg/mL dan ekspresi iNOS dengan IC₅₀ 0,049 mg/mL pada sel makrofag J774.A1 yang diinduksi LPS. Selain itu juga dilakukan penelitian secara *in vivo* yang menunjukkan penurunan ekspresi enzim iNOS.

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara senyawa fisetin dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Interaksi ikatan dan residu asam amino senyawa fisetin dengan reseptor COX-2 bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa fisetin dengan reseptor COX-2 memiliki ikatan hidrogen, ikatan van der waals, ikatan Pi-sigma, ikatan Pi-alkyl, dan ikatan unfavorable acceptor-acceptor. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino residu TYR A:341. Ikatan van der waals terbentuk pada asam amino residu ALA A:513, GLY A:512, TRP A:373, LEU A:370, PHE A:367, TYR A:371, SER A:516, TYR A:334, PHE A:504, ILE A:503, ARG A:499, SER A:339, HIS A:75. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu LEU A:338, VAL

A:509. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu VAL A:335, ALA A:502. Ikatan unfavorable acceptor-acceptor terbentuk pada ikatan GLN A:178.

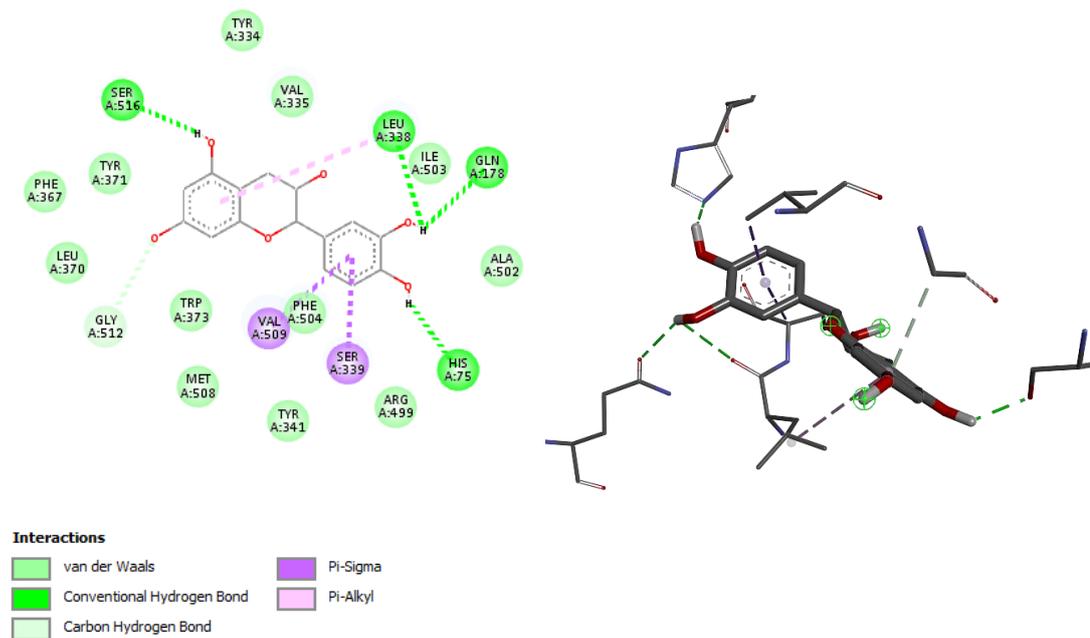
Berdasarkan Gambar 4.7 dan Gambar 4.10 dapat dilihat bahwa senyawa fisetin berinteraksi dengan COX-2 melalui interaksi residu asam amino yang sama dengan ligan alami pada PHE A:367, SER A:516, PHE A:504, ILE A:503, HIS A:75, dan VAL A:509. Berdasarkan Gambar 4.8 dan Gambar 4.10 terlihat bahwa senyawa fisetin memiliki ikatan hidrogen yang sama dengan senyawa ibuprofen pada TYR A:341 dan kemiripan interaksi residu asam amino lainnya pada SER A:516, LEU A:370, GLY A:512, ALA A:513, SER A:339, ILE A:503, PHE A:504, VAL A:335. Hal tersebut menunjukkan bahwa ikatan senyawa fisetin hampir sekuat ligan alami dan senyawa ibuprofen dilihat dari banyaknya kemiripan residu asam amino yang terbentuk, sehingga diharapkan senyawa fisetin akan memberikan afinitas yang sama dalam menghambat kerja COX-2.

Senyawa fisetin memiliki potensi sebagai antiinflamasi pada reseptor COX-2 karena memiliki afinitas dengan reseptor COX-2 tersebut dengan nilai ikatan sebesar -9.8 kkal/mol serta berinteraksi melalui beberapa ikatan interaksi residu asam amino yang sama dengan native ligand. Di samping itu hasil uji prediksi farmakokinetik dan toksisitas apigenin menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki profil farmakokinetika yang baik, yaitu HIA (83,75%), Sel CaCo2 ($0,05 \times 10^{-6}$ cm/s), PPB (97.04%), total clearane (0.42), bukan merupakan substrat OCT2, serta tidak memiliki toksisitas pada hati dan uji AMES.

Prediksi ini sesuai dengan Kim *et al* (2015) bahwa fisetin termasuk dalam golongan flavonoid dengan kerangka flavonol dimana cincin B terikat pada posisi C2 cincin. Fisetin diketahui memiliki aktivitas biologis yang beragam, seperti

antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, anti-osteoporosis, anti-diabetes, dan anti-karsinogenik. Fisetin sebagai antiinflamasi terjadi melalui penekanan aktivasi NFkB dan AP-1. Secara lebih lanjut Antika & Rita (2021) menjelaskan bahwa fisetin secara signifikan menurunkan sitokin pro-inflamasi interleukin-1-beta (IL-1 β) dan menurunkan produksi IL-6 pada *tumor necrosis alpha* (TNF- α). Fisetin juga dapat memblokir oksida nitrat yang menginduksi ekspresi sintase dan siklooksigenase-2 (COX-2) serta dapat menurunkan regulasi terkait ekspresi gen NFkB. Penghambatan pensinyalan NFkB dapat mengurangi ekspresi sitokin IL-4.

Kompleks ikatan serta residu asam amino pada interaksi antara senyawa catechin dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Interaksi ikatan dan residu asam amino senyawa catechin dengan reseptor COX-2 bentuk 2D (kiri) dan 3D (kanan)

Hasil visualisasi penambatan molekuler senyawa catechin dengan reseptor COX-2 memiliki ikatan hidrogen, ikatan van der waals, ikatan carbon hydrogen bond, ikatan Pi-sigma, dan ikatan Pi-alkyl. Ikatan hidrogen terbentuk pada asam amino

residu HIS A:75, SER A:516, LEU A:338, GLN A:178. Ikatan van der Waals terbentuk pada asam amino residu ARG A:499, TYR A:341, MET A:508, PHE A:504, TRP A:373, LEU A:370, PHE A:367, TYR A:371, TYR A:334, VAL A:335, ILE A:503, ALA A:502. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada asam amino residu VAL A:509, SER A:339. Ikatan Pi-alkyl terbentuk pada asam amino residu LEU A:338.

Berdasarkan Gambar 4.7 dan Gambar 4.11 dapat dilihat bahwa senyawa catechin berinteraksi dengan COX-2 melalui ikatan hidrogen yang sama dengan yang terjadi antara native ligand dengan COX-2, yaitu LEU A:338 dan GLN A:178. Selain itu, senyawa catechin memiliki kemiripan interaksi residu asam amino dengan native ligand pada TYR A:341, PHE A:504, PHE A:367, ILE A:503, ALA A:502, dan VAL A:335. Berdasarkan Gambar 4.8 dan Gambar 4.11 terlihat bahwa senyawa catechin memiliki interaksi ikatan hidrogen yang sama dengan senyawa ibuprofen pada HIS A:75 dan kemiripan interaksi residu asam amino lainnya pada LEU A:370, ALA A:502, ILE A:503. Hal tersebut menandakan bahwa tempat sisi aktif native ligand dan senyawa catechin berikatan dengan COX-2 juga sudah sama dan banyaknya kemiripan residu asam amino yang terbentuk menunjukkan bahwa ikatan catechin hampir sekuat ligan alami dan senyawa ibuprofen. Oleh karena itu, diharapkan senyawa catechin akan memberikan afinitas yang sama dalam menghambat kerja COX-2.

Senyawa catechin memiliki potensi sebagai antiinflamasi pada reseptor COX-2 karena memiliki afinitas dengan reseptor COX-2 tersebut dengan nilai ikatan sebesar -9.8 kkal/mol serta berinteraksi melalui beberapa ikatan interaksi residu asam amino yang sama dengan native ligand. Akan tetapi hasil uji prediksi

farmakokinetik dan toksisitas apigenin menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki profil farmakokinetika yang kurang baik, yaitu HIA (68.82%), Sel CaCo2 (-0.28×10^{-6} cm/s), PPB (92.06%), BBB (-1.05), tidak dapat dimetabolisme dan tidak dapat menekan aktivitas metabolisme sitokrom P450, total clearane (0.18), bukan merupakan substrat OCT2, serta tidak memiliki toksisitas pada hati dan uji AMES.

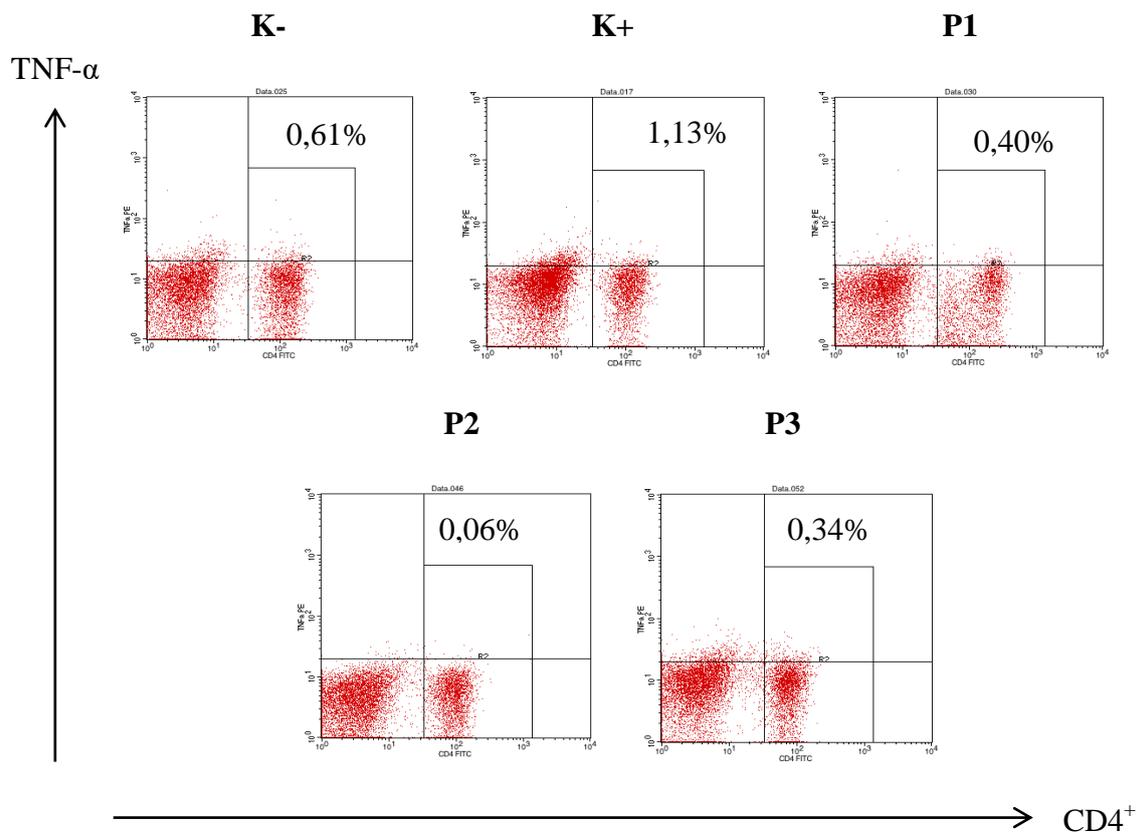
Prediksi ini sesuai dengan Katja *et al* (2021) bahwa catechin merupakan senyawa polifenol yang memiliki 15 atom karbon yang kerangka karbonnya terdiri dari dua gugus C6 (cincin benzene tersubstitusi) dan disambungkan dengan tiga atom karbon alifatik. Catechin dilaporkan memiliki senyawa aktif yang bersifat anti-kanker, anti-tumor, antioksidan, anti-inflamasi, anti-malaria, anti-mikroba, dan apoptosis. Secara lebih lanjut, Cheng *et al* (2019) menyebutkan bahwa catechin secara signifikan dapat menghambat ekspresi gen sitokin proinflamasi termasuk IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p35, dan enzim inflamasi termasuk iNOS dan COX-2. Selain itu juga meningkatkan ekspresi gen sitokin antiinflamasi, seperti IL-4 dan IL-10. Catechin juga menghambat aktivasi NF κ B dan AMPK serta memiliki kemampuan melemahkan respon peradangan yang dipicu oleh TNF- α melalui kaskade pensinyalan yang terlibat dalam sitokin dan peradangan.

4.2 Studi *In-Vivo*

4.2.1 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4⁺TNF- α

Data jumlah total sel T CD4⁺TNF- α pada masing-masing perlakuan, berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* memiliki nilai signifikansi $p=0,200$

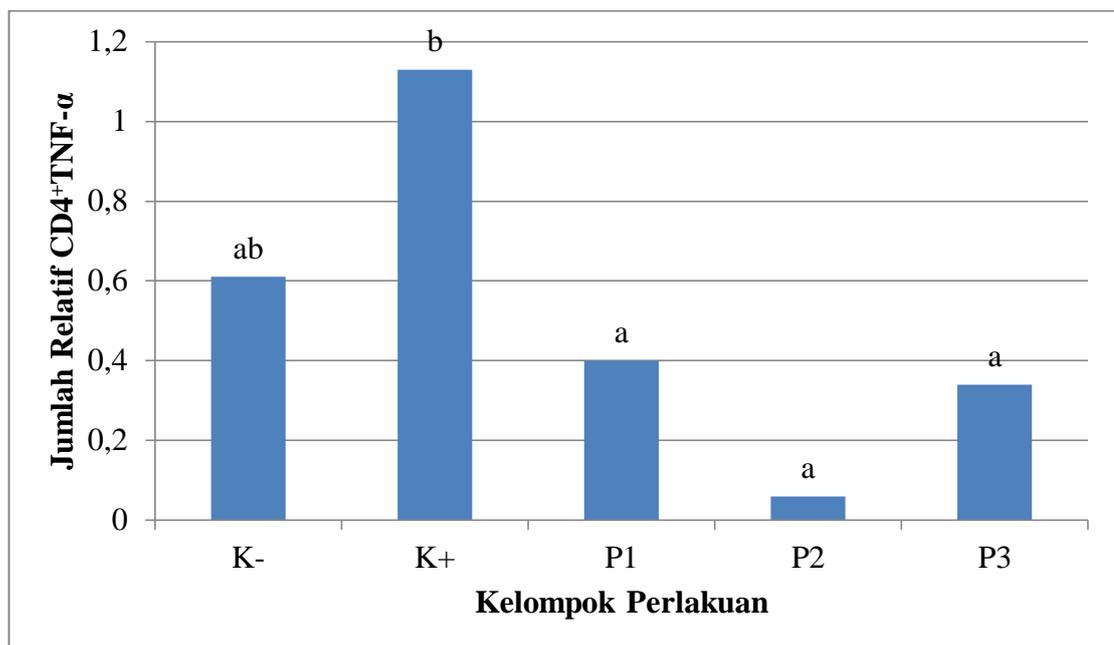
($p > 0,05$) sehingga data berdistribusi normal dan berdasarkan uji *Levene*, didapatkan nilai signifikansi $p = 0,257$ ($p > 0,05$) sehingga data bersifat homogen. Data tersebut kemudian dilanjutkan uji *One Way Anova*. Rata-rata jumlah total sel T $CD4^+TNF-\alpha$ yang didapatkan dari perhitungan masing-masing kelompok berdasarkan Gambar 4.9 yaitu, kelompok K- ($0,61\% \pm 0,35$), kelompok K+ ($1,13\% \pm 0,66$), P1 ($0,40\% \pm 0,37$), P2 ($0,06\% \pm 0,04$), dan P3 ($0,34\% \pm 0,58$).



Gambar 4.12 Presentase jumlah relatif sel T $CD4^+TNF-\alpha$ pada masing-masing perlakuan

Hasil analisis *flowcytometry* pada mencit yang diinduksi cisplatin dan diberi perlakuan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) terhadap aktivitas sel T $CD4^+TNF-\alpha$. Kelompok kontrol negatif menunjukkan jumlah relatif sel $CD4^+TNF-\alpha$ sebesar 0,61%. Jumlah sel relatif ini berbeda jauh dengan perlakuan

kontrol positif yang diinduksi cisplatin, yaitu 1,13%. Meningkatnya jumlah relatif sel $CD4^+TNF-\alpha$ ini dikarenakan terjadinya inflamasi dalam tubuh mencit akibat penginduksian cisplatin. Hal ini sesuai dengan Asfi *et al* (2014) bahwa sitokin yang disekresikan antara lain adalah $TNF-\alpha$ yang dibutuhkan untuk produksi $IFN\gamma$, di mana $IFN\gamma$ mampu meningkatkan CMI dan menginduksi diferensiasi Th menjadi Th1 dan pada akhirnya menginduksi proliferasi sel T $CD4$.



Gambar 4.13 Jumlah Relatif Sel T $CD4^+TNF-\alpha$

Setelah dilakukan pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terjadi penurunan jumlah sel T $CD4^+TNF-\alpha$. Pada perlakuan dengan dosis 25 mg/kgBB turun secara signifikan menjadi 0,40%. Pada perlakuan dengan dosis 50 mg/kgBB turun secara signifikan menjadi 0,06%. Hal ini juga terjadi pada perlakuan yang diberi jamu subur kandungan dengan dosis 75 mg/kgBB yang menunjukkan penurunan yang signifikan menjadi 0,34%. Nilai ini masih termasuk dalam rentang nilai normal kadar $TNF-\alpha$ dalam tubuh. Hal ini sesuai dengan Idriss & Naismith (2000) bahwa nilai normal $TNF-\alpha$ adalah 0 - 2.2 pg/mL.

Karyadi dan Ahmad (2019) menjelaskan bahwa TNF- α merupakan salah satu sitokin yang disekresi oleh sel Th1 dan sitokin utama yang terlibat pada proses inflamasi akut. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF- α dalam jumlah yang besar dan menimbulkan reaksi sistemik. Pada kadar rendah, TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF- α berperan dalam inflamasi sistemik dan pada kadar tinggi, TNF- α menimbulkan kelainan patologik syok septik.

Jumlah relatif sel T CD4⁺ TNF- α yang menurun pada perlakuan yang diberi nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* menunjukkan bahwa kombinasi tanaman tersebut memiliki efek antiinflamasi dengan menurunkan jumlah sel T CD4⁺ TNF- α . Efek tersebut berasal dari senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut. Hal ini sesuai dengan hasil studi *in silico* dalam penelitian ini bahwa senyawa yang berpotensi sebagai antiinflamasi dilihat dari nilai energi bebas ikatan terendah dengan protein NF κ B dan COX-2 yaitu senyawa lupiwighteone, apigenin, fisetin, dan catechin yang termasuk ke dalam golongan flavonoid yang dapat menghambat produksi sitokin proinflamasi.

Astika *et al* (2022) menjelaskan mekanisme kerja flavonoid sebagai antiinflamasi melalui beberapa jalur dengan penghambatan aktivitas NF κ B, siklooksigenase (COX), dan lipoksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrofil, serta penghambatan histamine. Selain itu flavonoid dapat menghambat sekresi enzim lisosom dan endothelial sehingga proliferasi dan eksudasi dari proses radang terhambat serta menurunkan ekspresi dan sekresi sitokin.

Senyawa flavonoid juga memiliki aktivitas imunomodulator. Putra *et al* (2020) menyebutkan imunomodulator merupakan agen farmakologis yang dapat memodulasi (mengubah atau mempengaruhi) sistem imun tubuh menjadi ke arah normal. Imunomodulator dapat mengatur keseimbangan sistem imun tubuh melalui mekanisme imunostimulan dan immunosupresan. Mekanisme flavonoid sebagai imunomodulator yaitu dengan meningkatkan aktivitas IL-12 dan proliferasi limfosit. Sel CD4⁺ akan mempengaruhi proliferasi limfosit kemudian menyebabkan sel Th-1 teraktivasi. Sel Th-1 yang teraktivasi akan mempengaruhi IFN- γ yang dapat mengaktifkan makrofag yang ditandai dengan meningkatnya aktivitas fagositosis secara cepat dan lebih efisien dalam membunuh antigen.

Asfi *et al* (2014) menjelaskan bahwa aksi flavonoid sangat kompleks, terkadang sinergis dan terkadang antagonis. Berdasarkan hal tersebut, dapat diketahui bahwa desain penelitian yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan aksi antagonis, di mana cara kerja immunosupresan berkebalikan dengan immunostimulan. Immunosupresan cenderung menghambat proses transkripsi dari sitokin sehingga sitokin-sitokin yang berperan dalam aktivasi sel semakin sedikit kadarnya. Immunosupresan menyebabkan penurunan jumlah IL-2, IFN- γ , dan TNF- α sehingga jumlah sel yang teraktivasi menjadi sedikit.

Pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dengan dosis 25 mg/kgBB mampu menurunkan kadar CD4⁺TNF- α tidak berbeda nyata dengan kelompok K- atau normal. Hal ini berkaitan dengan penggunaan nanopartikel yang membutuhkan dosis kecil untuk membawa obat dalam jumlah yang optimal dan lebih efisien. Sesuai dengan Martien *et al* (2012) peningkatan jumlah obat dalam darah pada penghantaran sistemik akan meningkatkan resiko

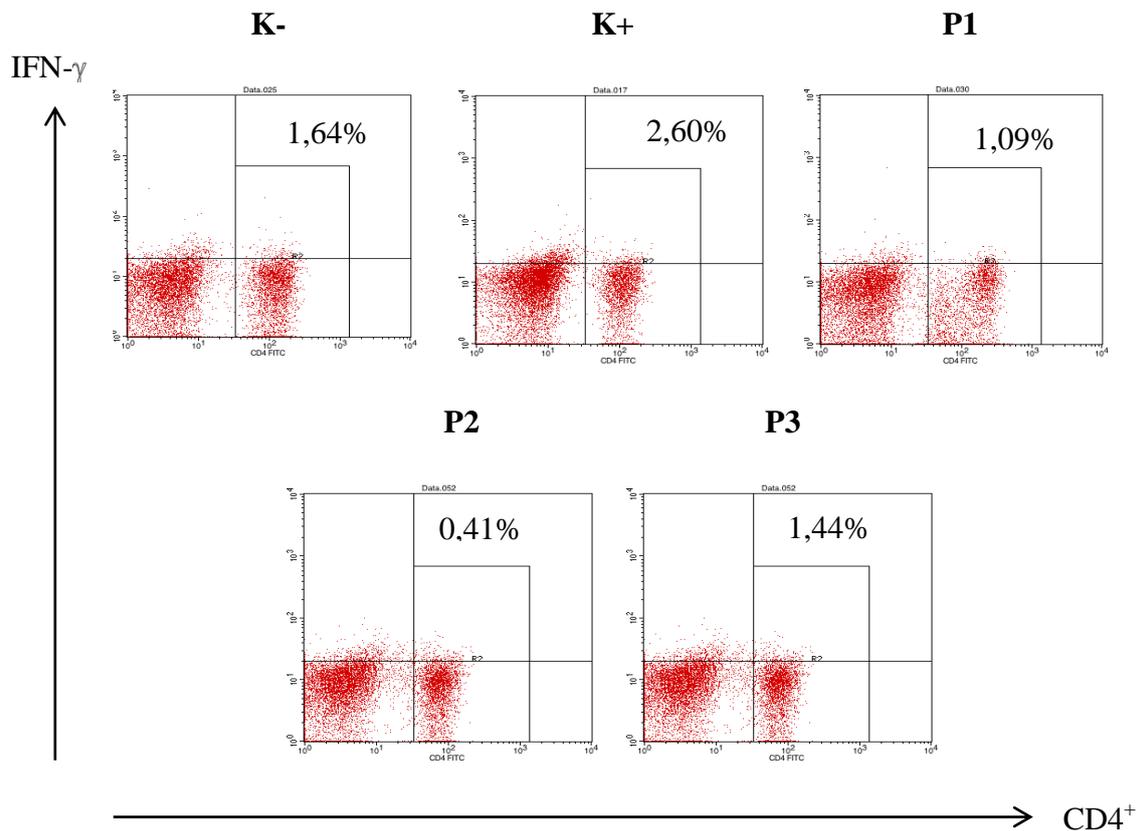
munculnya efek samping maupun efek balik, hingga pada resiko tercapainya batas kadar toksik. Penggunaan nanopartikel yang mampu menembus berbagai ruang yang tidak dapat ditembus oleh partikel berukuran besar, dapat dibuat dari berbagai bahan yang biokompatibel, serta dapat dibuat dengan metode yang sederhana dan murah menjadi solusi yang baik karena mampu memberikan efek farmakologis pada dosis yang lebih kecil.

4.2.2 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN- γ

Data jumlah relatif sel T CD4⁺IFN- γ pada masing-masing perlakuan, berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* memiliki nilai signifikansi $p=0,063$ ($p>0,05$) sehingga data berdistribusi normal dan berdasarkan uji *Levene*, didapatkan nilai signifikansi $p=0,294$ ($p>0,05$) sehingga data bersifat homogen. Data tersebut kemudian dilanjutkan uji *One Way Anova*. Rata-rata jumlah relatif sel T CD4⁺IFN- γ yang didapatkan dari perhitungan masing-masing kelompok berdasarkan Gambar 4.11 yaitu, kelompok K- ($1,64\% \pm 0,98$), kelompok K+ ($2,60\% \pm 0,63$), P1 ($1,09\% \pm 0,93$), P2 ($0,41\% \pm 0,45$), dan P3 ($1,44\% \pm 0,76$).

Hasil analisis *flowcytometry* pada mencit yang diinduksi cisplatin dan diberi perlakuan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P>0,05$) terhadap aktivitas sel T CD4⁺IFN- γ . Perlakuan kontrol negatif menunjukkan jumlah relatif sel CD4⁺IFN- γ sebesar 1,64%. Jumlah sel relatif ini berbeda jauh dengan perlakuan kontrol positif yang diinduksi cisplatin, yaitu 2,60%. Meningkatnya jumlah relatif sel CD4⁺IFN- γ ini dikarenakan terjadinya inflamasi dalam tubuh mencit akibat penginduksian cisplatin. Hal ini sesuai dengan Nitawati *et al* (2014) bahwa

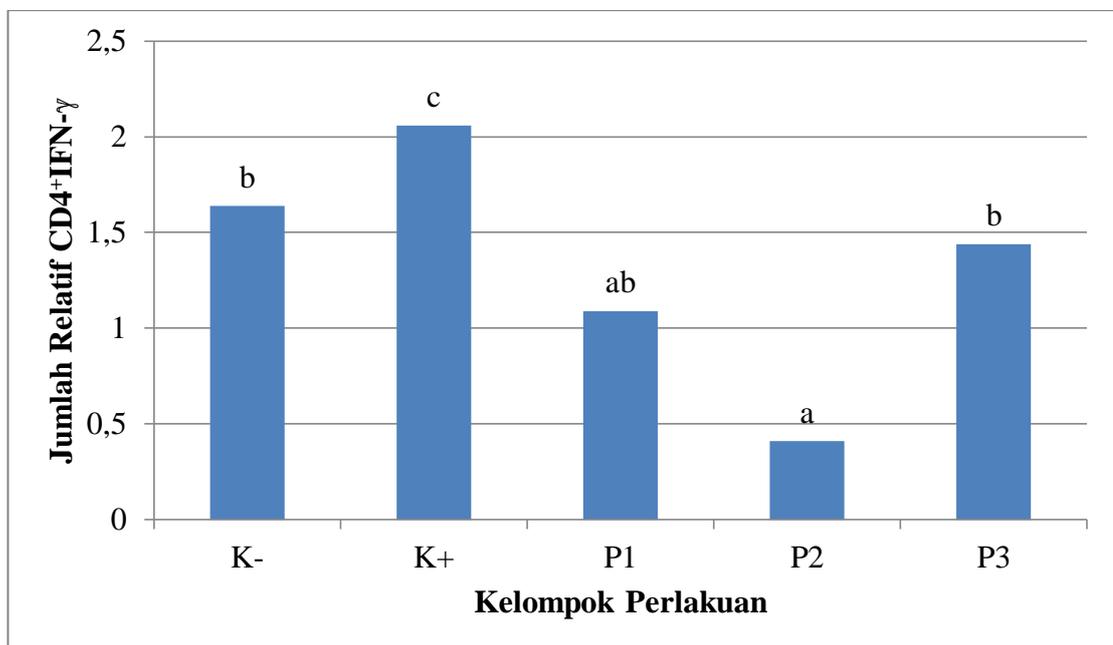
inflamasi kronis yang berlangsung lama ditandai dengan peningkatan limfosit dan makrofag yang disertai dengan proliferasi pembuluh darah. Limfosit T terutama T helper ini kemudian menghasilkan sitokin proinflamasi yang menandakan terjadinya inflamasi dalam tubuh, seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 .



Gambar 4.14 Presentase jumlah relatif sel T $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma$ pada masing-masing perlakuan

Setelah dilakukan pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terjadi penurunan jumlah sel T $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma$. Pada perlakuan dengan dosis 25 mg/kgBB turun secara signifikan menjadi 1,09%. Pada perlakuan dengan dosis 50 mg/kgBB turun secara signifikan menjadi 0,41%. Hal ini juga terjadi pada perlakuan yang diberi jamu subur kandungan dengan dosis 75 mg/kgBB yang menunjukkan penurunan yang signifikan menjadi 1,44%. Nilai tersebut masih berada dalam rentang normal. Sesuai dengan Sulistiani & Hesti (2015)

bahwa kadar IFN- γ pada tubuh sehat adalah kurang dari 2.0 pg/mL. IFN- γ merupakan salah satu mediator pro-inflamasi sitokin yang disekresi oleh limfosit Th1, sel NK, dan limfosit Tc, dengan sumber utama adalah limfosit Th1. Mekanisme perlindungan terhadap tubuh yang dilakukan IFN- γ terjadi melalui reseptor di membran sel dan dengan mengaktifkan gen yang memacu sel untuk memproduksi protein antivirus. IFN- γ akan mengaktifkan makrofag, sehingga makrofag akan mengalami peningkatan aktivitas fagositosis.



Gambar 4.15 Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN- γ

Jumlah relatif sel T CD4⁺IFN- γ yang menurun pada perlakuan yang diberi nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C.mangga*, dan *A. calamus* menunjukkan bahwa kombinasi tanaman tersebut memiliki efek antiinflamasi dengan menurunkan jumlah sel T CD4⁺IFN- γ . Efek tersebut berasal dari senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut. Hal ini sesuai dengan hasil studi *in silico* dalam penelitian ini bahwa senyawa yang berpotensi sebagai antiinflamasi dilihat dari nilai energi bebas ikatan terendah dengan protein NF κ B dan COX-2 yaitu

senyawa lupiwighteone, apigenin, fisetin, dan catechin yang termasuk ke dalam golongan flavonoid yang dapat menghambat produksi sitokin proinflamasi.

Perdana (2022) menjelaskan bahwa flavonoid memiliki kemampuan menghambat NFkB sehingga menurunkan produksi TNF- α , IL-1 β , dan IFN- γ yang berperan penting dalam kondisi inflamasi. Flavonoid dapat bekerja sebagai immunosupresan dengan menekan sistem imun melalui penghambatan terhadap transkripsi sitokin. Efek immunosupresi juga dapat menghambat proses fagositosis dan pengolahan antigen menjadi antigen imunogenik oleh makrofag, menghambat pengenalan antigen oleh sel limfosit, merusak sel limfoid, menekan diferensiasi dan proliferasi sel imunokompeten sehingga tidak akan terbentuk sel plasma dari antibodi atau sel T yang tersensitisasi untuk respon imun seluler. Immunosupresi juga mampu menghentikan produksi antibodi oleh sel plasma serta melenyapkan sel T tersensitisasi yang telah terbentuk., sehingga produksi sitokin proinflamasi menurun.

Penggunaan nanopartikel pada pemberian ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* pada mencit yang diinduksi cisplatin digunakan untuk meningkatkan bioavailabilitas obat untuk menangani kelarutan obat yang rendah dalam sirkulasi sistemik. Hal ini sesuai dengan Dzakwan & Widodo (2019) bahwa bioavailabilitas sediaan oral beberapa senyawa flavonoid sangat rendah disebabkan karena rendahnya kelarutan dalam air dan absorpsi yang terbatas. Pengcilan ukuran partikel menjadi bentuk nano terbukti dapat mempertahankan dan melindungi senyawa dari kerusakan, dapat memperluas ukuran partikel sehingga mampu meningkatkan kelarutan obat, absorpsi di usus, bioavailabilitas dan efektivitas dari

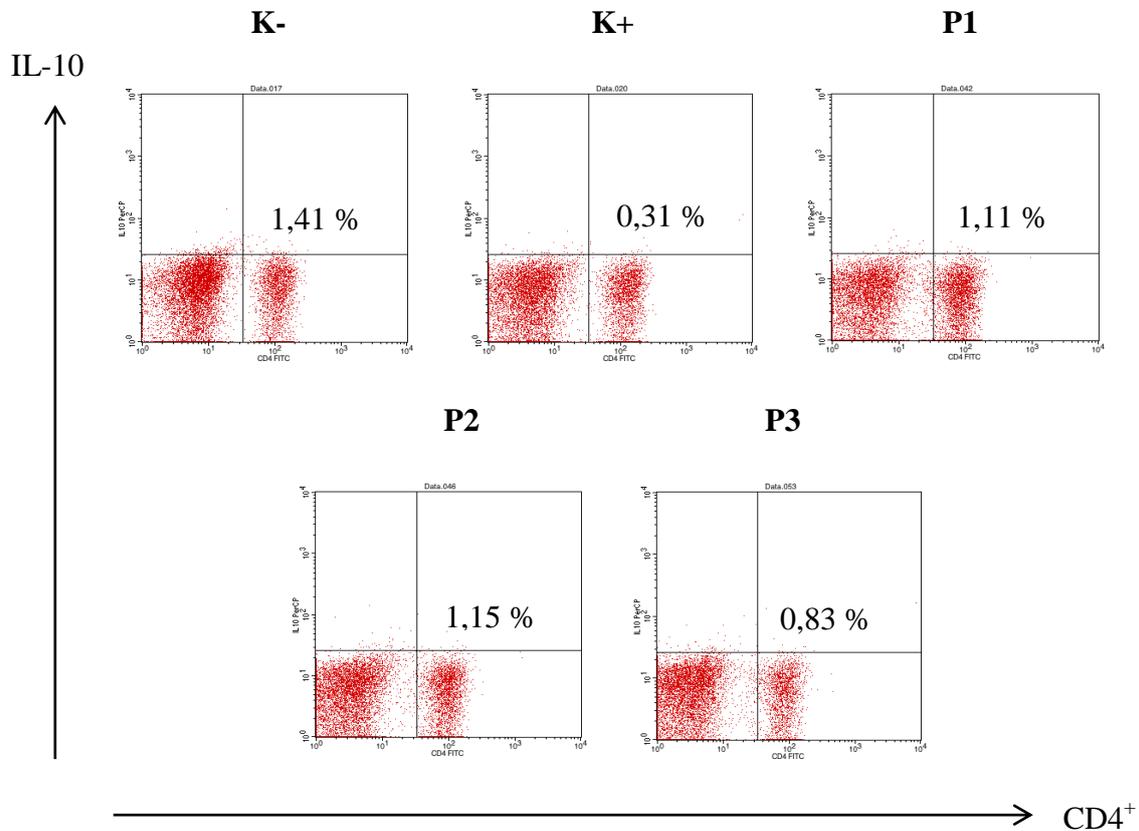
obat. Pada penelitian ini, penggunaan nanopartikel dengan dosis 25 mg/kgBB lebih efektif menurunkan kadar $CD4^+IFN-\gamma$.

4.2.3 Analisis Jumlah Relatif Sel T $CD4^+IL-10$

Data jumlah sel T $CD4^+IL-10$ pada masing-masing perlakuan, berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* memiliki nilai signifikansi $p=0,200$ ($p>0,05$) sehingga data berdistribusi normal dan berdasarkan uji *Levene*, didapatkan nilai signifikansi $p=0,072$ ($p>0,05$) sehingga data bersifat homogen. Data tersebut kemudian dilanjutkan uji *One Way Anova*. Rata-rata jumlah relatif sel T $CD4^+IL-10$ yang didapatkan dari perhitungan masing-masing kelompok berdasarkan Gambar 4.13 yaitu, kelompok K- ($1,41\% \pm 0,79$), kelompok K+ ($0,31\% \pm 0,13$), P1 ($1,11\% \pm 0,63$), P2 ($1,15\% \pm 0,48$), dan P3 ($0,83\% \pm 0,25$).

Hasil analisis *flowcytometry* pada mencit yang diinduksi cisplatin dan diberi perlakuan nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P>0,05$) terhadap aktivitas sel limfosit T $CD4^+$. Perlakuan kontrol negatif menunjukkan jumlah relatif sel $CD4^+IL-10$ sebanyak 1,41%. Jumlah sel relatif ini berbeda jauh dengan perlakuan kontrol positif yang diinduksi cisplatin, yaitu 0,31%. Hal ini diduga karena adanya induksi cisplatin yang menyebabkan kerusakan dan disfungsi ovarium sehingga meningkatkan radikal bebas dalam tubuh yang memicu terjadinya inflamasi. Shafia *et al* (2020) menyebutkan bahwa pada fase awal inflamasi, terlihat peningkatan sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan aktifnya sel imun. Sitokin proinflamasi dalam jumlah berlebihan dapat merusak dinding vaskular dan

mengakibatkan disfungsi organ. Sitokin antiinflamasi seperti IL-10 serta TGF- β dilepaskan untuk mengimbangi jumlah sitokin proinflamasi yang berlebihan.

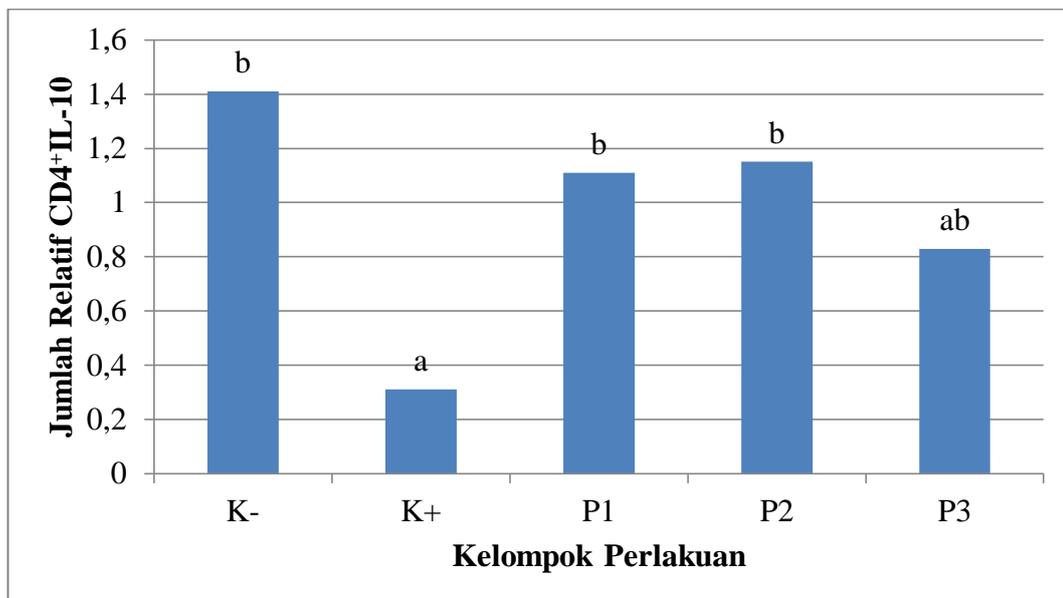


Gambar 4.16 Presentase jumlah relatif sel T CD4⁺IL-10 pada masing-masing perlakuan

Setelah dilakukan pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terjadi peningkatan jumlah sel T CD4⁺IL-10. Jumlah relatif sel CD4⁺IL-10 pada perlakuan dengan dosis 25 mg/kgBB naik secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol positif menjadi 1,11%. Demikian juga pada perlakuan dengan dosis 50 mg/kgBB yang naik secara signifikan menjadi 1,15%. Pada perlakuan yang diberi jamu subur kandungan dengan dosis 75 mg/kgBB juga menunjukkan kenaikan meskipun tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol positif menjadi 0,83%.

Masfufatun *et al* (2018) menyebutkan bahwa pada kondisi inflamasi, sitokin proinflamasi berperan meningkatkan fagositosis dan rekrutmen neutrofil sehingga

memediasi inflamasi. Sitokin IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi yang ketika kondisi inflamasi akan menghambat aktivitas dari sel Th2, sel NK, dan makrofag. IL-10 diproduksi untuk mengurangi inflamasi yang akan meminimalkan kondisi patologi akibat inflamasi yang berlebihan. Secara lebih lanjut Prihantika *et al* (2019) menjelaskan bahwa IL-10 merupakan sitokin anti inflamasi yang dikenal sebagai faktor penghambat sitokin-sitokin proinflamasi seperti IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α dan GM-CSF. IL-10 memiliki efek pleiotropik pada imunoregulasi dan peradangan yang diatur oleh sekresi sitokin Th1. IL-10 penting untuk menangkalkan respon imun yang hiperaktif dalam tubuh manusia.



Gambar 4.17 Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IL-10

Jumlah relatif sel T CD4⁺IL-10 yang meningkat pada perlakuan yang diberi nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C.mangga*, dan *A. calamus* menunjukkan bahwa kombinasi tanaman tersebut memiliki efek antiinflamasi dengan meningkatkan jumlah relatif sel T CD4⁺IL-10. Efek tersebut berasal dari senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut. Hal ini sesuai dengan hasil studi *in silico* dalam penelitian ini bahwa senyawa yang berpotensi sebagai antiinflamasi dilihat

dari nilai energi bebas ikatan terendah dengan protein NFkB dan COX-2 adalah senyawa lutein, apigenin, fisetin, dan catechin yang termasuk ke dalam golongan flavonoid.

Shafia *et al* (2020) menjelaskan mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi dengan menghambat siklooksigenase atau lipooksigenase sehingga menghambat sintesis prostaglandin dan stimulasi hidrosilasi prolin. Flavonoid juga menghambat aktivasi jalur signaling intraseluler NFkB yang akan menyebabkan turunnya sekresi sitokin dan kemokin proinflamasi. Selain itu, flavonoid juga menyebabkan peningkatan jumlah makrofag M2. Makrofag M2 akan mensekresikan sitokin antiinflamasi, diantaranya IL-4, IL-10 serta IL-13. Sehingga dengan banyaknya makrofag M2 produksi sitokin antiinflamasi, salah satunya dengan meningkatnya produksi IL-10.

4.3 Integrasi Al-Qur'an dan Hadist Terkait Hasil Penelitian

Ketidaksuburan atau infertil merupakan kondisi pasangan yang tidak mampu hamil setelah melakukan hubungan seksual tanpa alat kontrasepsi selama 12 bulan atau lebih (Muchtaromah *et al*, 2019). Penginduksian cisplatin dapat menyebabkan kondisi infertil pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang memiliki efek toksik pada folikel primordial berupa penghambatan regenerasi serta kerusakan dan disfungsi ovarium. Kerusakan dan disfungsi ovarium menyebabkan meningkatnya produksi radikal bebas dan dapat menyebabkan inflamasi dalam tubuh. Rasulullah SAW mengungkapkan bahwa Allah SWT telah menciptakan suatu penyakit bersama dengan obat penawarnya. Hal ini tertuang

dalam sabda Rasulullah SAW dalam hadits yang diriwayatkan Turmudzi, Abu Daud, dan Ibnu Majah berikut:

عن أُسامةَ بنِ شريكٍ رضيَ اللهُ عنه، قال: ((قالتِ الأعرابُ: يا رسولَ اللهُ، أَلَا نتداوَى؟ قال: نَعَمْ، يا عبادَ اللهِ تداوَوْا؛ فإنَّ اللهُ لم يَضَعْ داءً إلَّا وَضَعَ له شفاءً

Artinya: “Dari Usamah bin Syuraik ra, ia berkata: Orang-orang Arab Badui berkata: Wahai Rasulullah, bolehkah kami berobat?, Rasul menjawab: Ya, wahai hamba Allah berobatlah. Sesungguhnya Allah tidak menciptakan penyakit kecuali menciptakan penawarnya (HR. Turmudzi, Abu Daud, dan Ibnu Majah)

Hadits di atas menjelaskan bahwa manusia diperbolehkan untuk melakukan pengobatan demi kesehatannya, tetapi mereka tidak dibolehkan berobat menggunakan sesuatu yang haram. Haram yang dimaksud dapat berupa keharaman dari sisi kandungan obat maupun dari metode berobatnya. Melakukan pengobatan untuk menyembuhkan penyakit bukan merupakan sikap melawan takdir dan tawakal pada Allah SWT, melainkan seperti halnya makan untuk menghilangkan lapar atau mengenakan pakaian agar tidak kedinginan. Hal-hal tersebut termasuk dalam proses dan usaha sebab-akibat yang dapat mendatangkan pahala dari Allah SWT (Razali, 2021).

Inflamasi yang terjadi dalam tubuh dapat diatasi menggunakan tanaman herbal tradisional menggunakan tanaman herbal *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*. Secara implisit, pemanfaatan tanaman sebagai obat terdapat dalam QS. Asy-Syu'ara [26]: 7 yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi ini berbagai macam tumbuhan-tumbuhan yang baik*” (QS. Asy-Syu’ara [26]: 7)

Al-Qurtubi menjelaskan pada ayat tersebut terdapat tiga kata penting, yaitu tumbuh-tumbuhan, memperhatikan, dan baik serta mulia. Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan tumbuh-tumbuhan yang baik dan mulia di bumi ini agar senantiasa diperhatikan oleh manusia. Maksud dari tumbuh-tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang memiliki banyak manfaat, seperti sebagai bahan pangan dan obat-obatan (Al-Qurtubi, 2008).

Penggunaan ekstrak nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* menjadi obat antiinflamasi perlu dilakukan penelitian dan pengujian lebih lanjut agar efektif penggunaannya. Proses penelitian dan pengujian secara tersirat tertuang dalam Q.S Yunus [10]: 101 sebagai berikut:

قُلْ أَنْظَرُوا مَاذَا فِي السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَمَا تُغْنِي الْآيَاتُ وَالنُّذُرُ عَنْ قَوْمٍ لَا

يُؤْمِنُونَ ﴿١٠١﴾

Artinya: “*Katkanlah (wahai Muhammad): Perhatikanlah apa yang ada di langit dan di bumi*” (Q.S Yunus [10]: 101)

Ayat di atas memiliki kata *unzhuru* yang berarti “perhatikan”, Baiquni mengartikan kata tersebut sebagai usaha untuk tidak hanya memperhatikan sesuatu dengan pikiran kosong, tetapi memperhatikan secara seksama tanda-tanda kekuasaan Allah SWT dan arti dari tanda-tanda tersebut (Fakhri, 2010). Salah satu usaha memperhatikan kekuasaan Allah SWT adalah dengan melakukan penelitian dalam berbagai bidang, seperti alam semesta, lingkungan sekitar, dan tubuh manusia. Hal ini menandakan bahwa di tubuh manusia dan lingkungan sekitar

terdapat banyak hal yang dapat digunakan sebagai objek penelitian dan kajian (Razali, 2021).

Hasil penelitian terkait potensi nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* sebagai antiinflamasi secara in-silico dan in-vivo menunjukkan bahwa ekstrak tumbuh-tumbuhan tersebut dapat menurunkan inflamasi yang terjadi dalam tubuh sehingga keseimbangan fisiologis tubuh dapat terjaga. Secara implisit, keseimbangan fisiologis tubuh tertuang dalam Q.S Al-Mulk [67]: 3 yang berbunyi:

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا ۗ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ ۗ فَأَرِجِ
الْبَصَرَ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ ﴿٣﴾

Artinya: “Yang menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Tidak akan kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang pada ciptaan Tuhan yang Maha Pengasih. Maka lihatlah sekali lagi, adakah yang kamu lihat sesuatu yang cacat?” (Q.S Al-Mulk [67]: 3)

Maha besar Allah yang telah menciptakan alam semesta, termasuk langit dan bumi beserta isinya dengan teratur dan seimbang. Allah SWT menciptakan segala sesuatu secara berpasangan agar keseimbangan dan keteraturan dalam hidup dapat terjaga. Hal ini sesuai dengan konsep homeostatis dalam tubuh manusia. Homeostatis merupakan mekanisme yang terjadi dalam tubuh untuk mengatur, mempertahankan dan menjaga keseimbangan fisiologis tubuh. Mekanisme homeostatis sangat penting bagi tubuh, karena apabila terjadi ketidakseimbangan dalam tubuh, maka fungsi tubuh akan terganggu dan menimbulkan berbagai macam penyakit (Ahmad, 2016).

Begitupun dalam penelitian ini, penginduksian cisplatin dapat menyebabkan inflamasi dengan meningkatkan pembentukan *Reactive oxygen species* (ROS) yang reaktif dan menyebabkan rusaknya komponen sel serta mutasi sehingga terjadi peningkatan produksi sitokin dalam tubuh. Berdasarkan hasil penelitian secara in-silico, ekstrak nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* mengandung senyawa aktif yang memiliki aktivitas antiinflamasi, terutama dari golongan flavonoid melalui penghambatan NFkB dan COX-2.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antiinflamasi melalui beberapa jalur dengan penghambatan aktivitas NFkB, siklooksigenase (COX), dan lipoksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrofil, penghambatan histamine sehingga proliferasi dan eksudasi dari proses radang terhambat serta menurunkan ekspresi dan sekresi sitokin (Astika *et al*, 2022). Selain itu, juga memiliki aktivitas immunosupresan, di mana cenderung menghambat proses transkripsi dari sitokin sehingga sitokin-sitokin yang berperan dalam aktivasi sel semakin sedikit kadarnya. Immunosupresan flavonoid menyebabkan penurunan jumlah IL-2, IFN- γ , dan TNF- α sehingga jumlah sel yang teraktivasi menjadi sedikit (Asfi *et al*, 2014).

Flavonoid juga menghambat aktivasi jalur signaling intraseluler NFkB yang akan menyebabkan turunnya sekresi sitokin dan kemokin proinflamasi. Selain itu, flavonoid juga menyebabkan peningkatan jumlah makrofag M2. Makrofag M2 akan mensekresikan sitokin antiinflamasi, diantaranya IL-4, IL-10 serta IL-13. Sehingga dengan banyaknya makrofag M2 produksi sitokin antiinflamasi, salah satunya dengan meningkatnya produksi IL-10 (Shafia *et al*, 2020).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah:

1. Nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* mengandung 123 senyawa bioaktif dengan 72 senyawa memiliki aktivitas tinggi sebagai antiinflamasi berdasarkan skrining dari PASS Online dan sebanyak 41 senyawa memenuhi aturan *lipinski rule of five* yang dilanjutkan dengan prediksi ADMET serta *molecular docking*. Analisis *molecular docking* terhadap protein NFkB didapatkan senyawa Lupiwighteone yang memiliki nilai energi bebas terendah, yaitu -9.3 dan analisis *molecular docking* terhadap protein COX-2 didapatkan senyawa Apigenin, Fisetin, dan Catechin yang memiliki nilai energi bebas terendah, yaitu -9.8. Keempat senyawa tersebut dimungkinkan memiliki potensi sebagai antiinflamasi yang dapat menghambat produksi sitokin melalui jalur pensinyalan NFkB dan COX-2.
2. Terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terhadap kadar CD4⁺TNF- α , CD4⁺IFN- γ , dan CD4⁺IL-10 melalui aktivitas antiinflamasi dan immunosupresan dengan dosis efektif 25 mg/kgBB.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada senyawa hasil analisis *in-silico* yang memiliki aktivitas antiinflamasi secara *in-vivo*.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait mekanisme hubungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiinflamasi dengan produksi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait jumlah absolut dari sel CD4⁺ agar dapat diketahui secara pasti jumlah per volumenya dalam limpa.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait komponen sistem imun lainnya untuk mengetahui lebih detail terkait mekanisme antiinflamasi dari nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th edition. Philadelphia: WB Saunders Company
- Abbas, AK. Lichtman AH & Phillai S. 2007. *Cellular and Molecular Immunologi* 6th edition. Elsevier Publisher. Philadelphia
- Abdassah, Marline. 2015. Nanopartikel Dengan Gelas Ionik. *Farmaka*. Vol 15 (1)
- Abdullah, Surya Sumantri, P. P. Putra, I. Antasionasti, G. Rundengan, E. J. South, R. P. I. Abdullah, F. Abdullah. 2021. Analisis Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik, dan Toksikologi Pada Pericarpium Pala (*Myristica fragransa*) Secara Artificial Intelligence. *Chem. Prog*. Vol. 14 (2)
- Ahmad, Hamzah. 2016. Homeostatis Kehidupan Sebagai I'jaz Al-Qur'an. *Hikmah*. Vol. 12 (2)
- Ajayi, Ayodeji Folorunsho & Roland Eghoghosa Akhigbe. 2020. Staging of The Estrous Cycle and Induction of Estrus in Experimental Rodents: an Update. 2020. *Fertility Research and Practice*. Vol. 6 (5)
- Akunna GG. Nwafor J. Egwu OA. Ezemagu UK. Obaje G. Adepoju. Akingbade AM. 2017. Cisplatin-Induced Ovarian Cytotoxicity and The Modulating Role of Aqueous Zest Extract of *Citrus limonium* (AZECL) in Rat Models. *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy*. Vol. 6 (3)
- Allen, C.M., F. Lopes, R.T. Mitchell, N. Spears. 2020. Comparative Gonadotoxicity of the Chemotherapy Drugs Cisplatin and Carboplatin on Prepubertal Mouse Gonads. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 26 (3): 129-140. doi: [10.1093/molehr/gaaa008](https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa008)
- Al-Qurtubi, S. I. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam
- Antika, L. D., Rita M. D. 2021. Pharmacological Aspects of Fisetin. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 11 (1): 1-9. doi: [10.4103/2221-1691.300726](https://doi.org/10.4103/2221-1691.300726)
- Anuar, Ainaa Hazirah B. S, Jutti L. 2018. Review: Seledri *Apium graveolens* Linn Sebagai Tablet Antiinflamasi. *Farmaka*. Vol. 16 (1): 72-82
- Apriali, Kirka Dwi, E. Triana, M. I. Farhani, A. Khoirunnisa, Y. A. Nur'aini. 2022. Studi Penambatan Molekul dan Prediksi ADMET Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* L.) Sebagai Inhibitor BACE1. *Fitofarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*. Vol. 12 (1): 58-67. DOI : [10.33751/jf.v12i1.4351](https://doi.org/10.33751/jf.v12i1.4351)
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 Therapy Review of New Approach. *Pharmacol*. 55:241-69
- Asfi, Nida, M. S. Djati. 2014. Perkembangan Sel T CD4 dan CD62L Pada Organ Spleen Mencit yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium* Setelah Pemberian Ekstrak Ethanol Daun *Polyscias obtusa* dan *Elephantopus scaber*. *Jurnal Biotropika*. Vol. 2 (4)
- Ashley, N.T. Weil, Z.M & Nelson, R.J. 2012. Inflammation: Mechanism, Costs and Natural Variation. *Annual Review Evol System*. 12(43): 385-406
- Astika, Rahmila Y, F. Sani K., Elisma. 2022. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni*) Pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. Vol. 8 (1): 14 – 23

- Balakrishnan, Rengasamy. Duk-Yeon Cho. In Su Kim. Sang Ho Seol. Dan Dong-Kug Choi. 2022. Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential of α - and β -Asarone in the Treatment of Neurological Disorders. *Antioxidants*. 11, 281. <https://doi.org/10.3390/antiox11020281>
- Baratawidjaja, KG. dan Rengganis I. 2012. *Imunologi*. Jakarta: Dasar Badan Penerbit FKUI
- Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. 2007. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*. Vol. 2 (4)
- Candra, Gede Ngurah Hadi. I Made Adnyana Partha Wijaya. 2021. *Molecular Docking* Kaempferol Sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis Secara *In Silico*. *Jurnal Ilmiah Medicamento*. Vol. 7 (1): halaman 13-18. e-ISSN: 2356 - 4814 <https://doi.org/10.36733/medicamento.v7i1.1497>
- Cartaxo, A. 2018. Nanoparticles Types and Properties – Understanding These Promising Devices in The Biomedical Area. *International Journal of Nanomedicine*. Pp 1-8
- Cheng, A.W, Xin T, Jin Y.S., Chun M.G, Chao L, Xu G. 2019. Catechin attenuates TNF- α induced Inflammatory via AMPK-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *PLOS ONE*. Vol. 14 (5): e0217090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217090>
- Daina, A., O. Michielin, & V. Zoete. 2017. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness, and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. 7: 42717
- Delvess PJ, Roit IM. 2000. The Immune system, first of two part. *N Engl J Med*. 343(1)
- Dy M, Vasquez A, Bertoglio J, Theze J. 1999. General Aspect of Cytokine Properties and Functions. Is Theze J editor. *The Citokine Network and Immune-Functions*. New York: Oxford University Press. P.1-13
- Dzakwan, Muhammad. Widodo Priyanto. 2019. Peningkatan Kelarutan Fisetin dengan Teknik Kosolvensi. *Jurnal Poltektegal Parapemikir*. Vol. 8 No. 2
- Erbas, Oytun. L. Akman, A. Yavasoglu, M.C. Terek, T. Akman, D. Taskiran. 2014. Oxytocin Improves Follicular Reserve in a Cisplatin-Induced Gonadotoxicity Model in Rats. *Biomed Res Int*. 2014:703691. doi: 10.1155/2014/703691
- Fadilaturahmah. Resti Rahayu, Putra Santoso. 2022. In Silico Study on Anti-Inflammatory Effect of Bioactive Compounds of Velvet Bean (*Mucuna pruriens*) Leaves Againsts NF-kB Activation Pathway. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. Vol. 9: 168-174. DOI : 10.25077/jsfk.9.sup.168-174.2022
- Fadlan, Arif, T. Warsito, Samoko. 2021. Studi In Silico Potensi Antikanker Senyawa Kaempferida. *Alchemy: Journal of Chemistry*. Vol. 10 (1): 14-21
- Fakih, Taufik Muhammad, H. A. Wisnuwardhani, M. L. Dewi, D. S. F. Ramadhan, A. F. Hidayat, R. Prayitno. 2021. Simulasi Dinamika Molekuler Senyawa Asam Ferulat dan Turunannya dari Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus*) Sebagai Inhibitor Enzim Tirosinase. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. Vol. 8 (2): 208 – 220 DOI: 10.25077/jsfk.8.2.208-220.2021
- Fakih, Taufik Muhammad. Nurfadillah Hazar. Mentari Luthfika Dewi. Tanisa Maghfira Syarza. Anggi Arumsari. 2021. Studi In Silico Mekanisme Aksi Senyawa Ftalosianina Sebagai Kandidat Fotosensitizer dalam Terapi Covid-

- 19 Berbasis Fotodinamika. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*. Vol. 4 (1) 2599-0047
- Field, Andy. 2009. *Discovering Statistics Using SPSS*. Los Angeles: Sage
- Garavito, R. M., M. G. Malkowski, dan D. L. DeWitt. 2002. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 68–69: 129–152
- Gonfloni, Stefania. 2010. Modulating c-Abl Nuclear Activity as a Strategy to Preserve Female Fertility. *Cell Cycle*. Vol. 9 (2)
- Hadi, Samsul, A. Khairunnisa, S. N. Khalifah, S. Oktaviani, S. O. Sari, U. N. Hapifah. 2021. Skrining Inhibitor NF-kB *Combretum indicum* dengan Metode Docking. *Pharmacom: Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol. 18 (2). <http://journals.ums.ac.id/index.php/pharmacom>
- Hartanti, I.R, A. A. Putri, N. N. Auliya, A. L. Triadenda, E. Laelasari, C.Suhandi, M. Muchtaridi. 2022. Molecular Docking Senyawa Xanton, Benzofenon, dan Triterpenoid Sebagai Antidiabetes dari Ekstrak Tumbuhan *Garcinia cowa*. *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*. Vol. 16 (1). DOI: <https://doi.org/10.24843/JCHEM.2022.v16.i01.p10>
- Hernawan, Udhi Eko dan Ahmad Dwi Setyawam. 2003. Review: Senyawa Organosulfur Bawang Putih (*Allium sativum* L.) dan Aktivitas Biologinya. *Biofarmasi*. Vol. 1 (2)
- Hidayat, Ahmad. Aprilia Indra Kartika. Meutia Srikandi Fitria. 2021. Perbandingan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Pada Tukang Parkir 1-3 Tahun dan >3 Tahun Dengan Metode ELISA. *Jurnal Analisis Medika Biosains (JAMBS)*. Vol. 8 No. 2 : pp 71 - 76. <https://jambs.poltekkes-mataram.ac.id/index.php/home/index>
- Hussain, Suhail Mohammed, M. S. Hussain, A. Ahmed, N. Arif. 2016. Characterization of Isolated Bioactive Phytoconstituents from *Flacourtia indica* as Potential Phytopharmaceuticals – An *in silico* Perspective. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Vol. 5 (6): 323-331
- Idriss HT, Naismith JH. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship. *Microsc Res Tech*. Aug1; 50 (3): 184-195. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.PMID: 10891884
- Ifora, Ifora. Bella Sintia. Yoneta Srangenge. 2021. Pengaruh Penghambatan Enzim Siklooksigenase-2 dan Aktivitas Antiinflamasi dari Ekstrak Daun Ketumbar (*Coriandrum sativum* L.). *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. Vol. 11(1): 17-24. DOI: <https://doi.org/10.22435/jki.v11i1.3487>
- Ifora. Fitra Fauziah. Suci Asmi Mayora. 2020. Aktivitas Anti-Inflamasi dan Daya Hambat Siklooksigenase-2 Ekstrak Etanol Daun Tembelean (*Lantana camara* L.). *Jurnal Farmasi Higea*. Vol. 12 (1)
- Jorgovanovic, D. Song M. Wang L. Zhang Y. 2020. Roles of IFN- γ in Tumor Progression and Regression: A review: *Biomarker Research*. Vol. 8(1): 1-16
- Juliarta, I Gede. Ni Kadek Mulyantari, I Wayan Putu Sutirta Yasa. 2018. Gambaran Hepatotoksisitas (ALT/AST) Penggunaan Obat Anti Tuberkulosis Lini Pertama dalam Pengobatan Pasien Tuberkulosis Paru Rawat Inap RSUP Sanglah Denpasar Tahun 2014. *E-Jurnal Medika Udayana*. Vil. 7 (10).
- Karyadi, Edi. Ahmad Syaifyi. 2019. Ekspresi Kadar *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) Cairan Sulkus Gingiva Pada Penderita Gingivitis (Kajian Pengguna

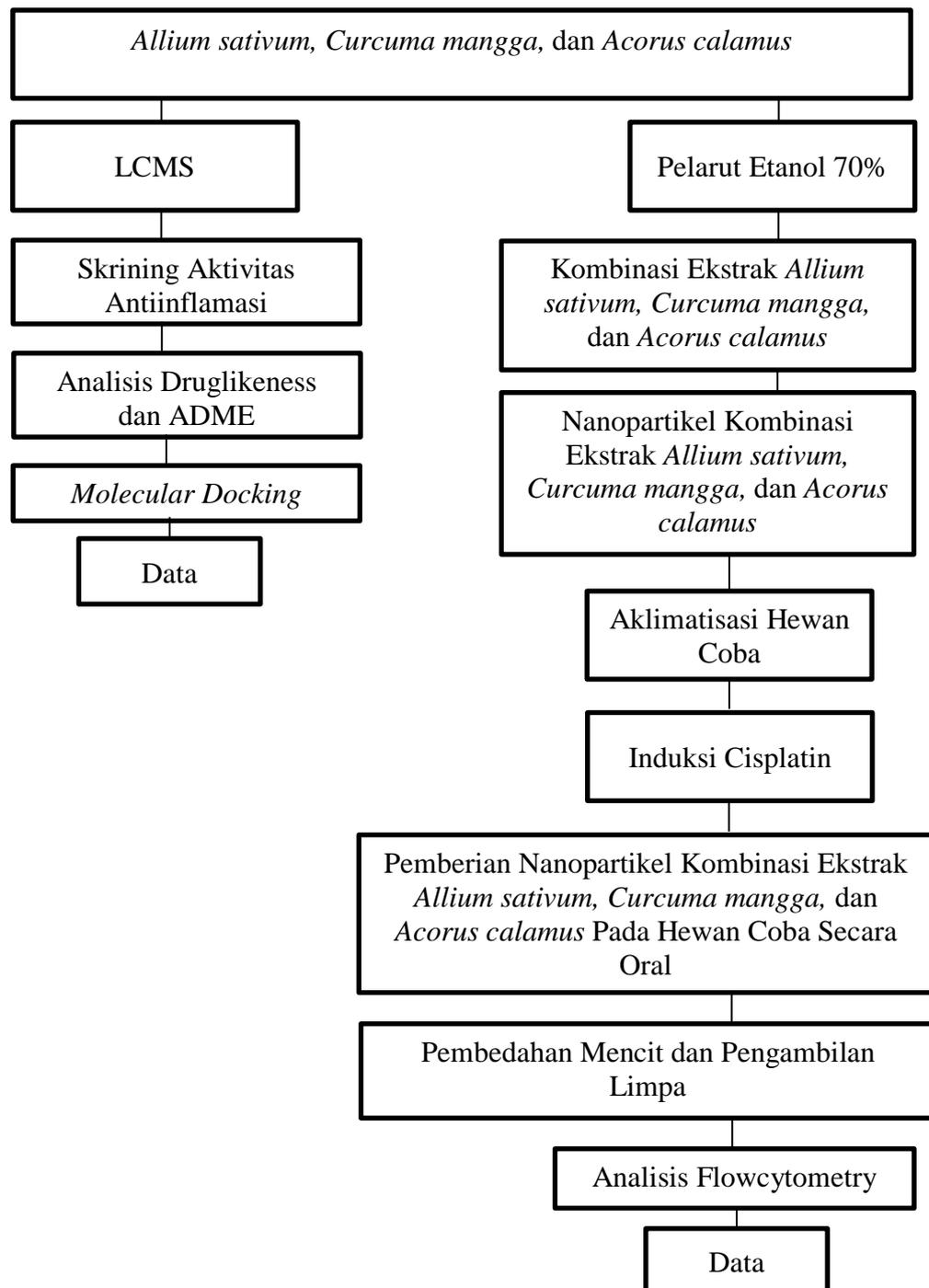
- Kontrasepsi Pil, Suntik, dan Implan). *Jurnal Ilmu Kedokteran Gigi*). Vol.2 (1). 2579-7239
- Katja, D.G, Sisilia A. M., Max R.J.R., Unang S., Erina H. 2021. Senyawa Katekin (Flavonoid) dari Kulit Batang *Chisocheton balancae* C.DC (Meliaceae). *Jurnal Iliah Sains*. Vol. 21 (2): 161-165. DOI: <https://doi.org/10.35799/jis.v21i2.35777>
- Khalidah, Amelia Rizky. 2020. Literature Review: Mekanisme Resistensi Kemoterapi Berbasis Platinum. *Jurnal Kesehatan*. Vol. 11, No. 1. <http://ejournal.poltekkes-tjk.ac.id/index.php/JK>
- Kim, J.H, Mi Y.K, Jong H.K, Jae Y.C., 2015. Fisetin Suppresses Macrophage-Mediated Inflammatory Responses by Blockade of Src and Syk. *Biomol Ther (Seoul)*. Vol. 23 (5): 414-420. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.036>
- Krihariyani, Dewi, R. Sasongkowati, E. Haryanto. 2020. Studi In Silico Sifat Farmakokinetik, Toksisitas, dan Aktivitas Imunomodulator Brazilein Kayu Secang Terhadap Enzim 3-Chymotrypsin-Like Cysteine Protease *Coronavirus*. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science*. Vol. 1 (1): 76-90
- Kumar, B. P., Soni, M., Bhikhalal, U. B., Kakkot, I. R., Jagadeesh, M., Bommu, P., and Nanjan, M. J. 2009. Analysis of physicochemical properties for drugs from nature. *Medicinal chemistry research*. Vol. 19, No. 8 : 984-992
- Kumari, Beena. 2018. A Review on Nanoparticles: Their Preparation Method And Applications. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*. Vol. 5 (2)
- Lopez, N.L., E.P.G Grijalva, D.L.A.Perez, J.B. Heredia. 2016. Flavonoid as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 921. doi:10.3390/ijms17060921
- Maftucha, Nissa. Rosario TM, Rika A, Petra C, Regina B. 2022. Potensi Senyawa Turunan Xanton dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Sebagai Inhibitor Protein *Mycobacterium tuberculosis*: Studi *In Silico*. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. Vol. 7 (2): 123-128
- Makatita, Fahrani Anggraeni. Rihuh Wardhani. Nuraini. 2020. Riset *In Silico* dalam Pengembangan Sains di Bidang Pendidikan, Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana Sebagai Agen Anti-Aging. *Jurnal Abdi*. Vol. 2 (1)
- Malonda, Thomas Agustinus. 2017. *Pencegahan dan Penatalaksanaan Nefrotoksisitas Kemoterapi Cisplatin pada Kanker Ovarium*. Sari Pustaka. Denpasar : Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah.
- Mardianingrum, Richa, K. R. Bachtiar, S. Susanti, A. Nuraisah, R. Riswanto. 2021. Studi In Silico Senyawa 1,4-Naphthalenedione-2-Ethyl-3-Hydroxy Sebagai Antiinflamasi dan Antikanker Payudara. *Alchemy: Jurnal Penelitian Kimia*. Vol. 17 (1): 83-95. DOI: 10.20961/alchemy.17.1.43979.83-95
- Mardiyati, Etik. Sjaikhurrizal El Muttaqien. Damai Ria Setyawati. 2012. Sintesis Nanopartikel Kitosan-*Trypoly Phosphate* dengan Metode Gelasi Ionik: Pengaruh Konsentrasi dan Rasio Volume Terhadap Karakteristik Partikel. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan*. ISSN 1411-2213
- Martien, Ronny. Adhyatmika. Iramie D.K. Irianto, Verda Farida, Dian Purwita Sari. 2012. Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik*. Vol. 8 No. 1

- Marvita, S. S., Chaerunisaa, A. Y., & Gozali, D. (2021). Penggunaan Polimer Golongan Polisakarida untuk Enkapsulasi Zat Aktif dengan Perbedaan Sifat Keasaman. *Majalah Farmasetika*, 6(4), 322-343
- Masfufatun. Putu Oky AT, Loo Hariyanto R, Afaf Baktir. 2018. Kadar IL-6 dan IL-10 Serum Pada Tahapan Inflamasi di *Rattus norvegicus* yang terinfeksi *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 30 No. 1
- Mediansyah, Aulian. Soraya Rahmanisa. 2017. Hubungan Ibuprofen Terhadap Ulkus Gaster. *Majority*. Vol. 6 No. 1
- Medzhitop R, Janeway C. 2000. Innate Immunity. *N Eng J Med*. 343 (5)
- Moutia, M. Habti & Badou A. 2018. In Vitro and In Vivo Immunomodulator Activities of *Allium sativum* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 18 (1)
- Muchtaromah B, Muti'ah R, Yusmalasari DR, Mardiyana P, Sharmin T, Fadholly A. 2020. Efficacy of *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, and *Acorus calamus* Extract Combination on Rat Fertility. *Pharmacognosy Journal*. Vol. 12 (1): 197-203
- Muchtaromah, Bayyinatul. Didik Wahyudi. Mujahidin Ahmad. Rahmi Annisa. 2020. Nanoparticle Characterization of *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, *Acorus calamus* as a Basic of Nanotechnology On Jamu Subur Kandungan Madura. *Pharmacognosy Journal*. Vol. 12 (5)
- Muchtaromah, Bayyinatul. Mujahidin Ahmad. Emy Koestanti S. Yuni Ma'rifatul A. Velayati Labone A. 2017. Phytochemicals, Antioxidant, and Antifungal Properties of *Acorus calamus*, *Curcuma mangga*, and *Allium sativum*. *The Veterinary Medicine International Conference 2017*. Vol 2017
- Muchtaromah, Bayyinatul. Rahmi Annisa. Sofiyah. 2019. Pengaruh Polih herbal Ekstrak Jeringau, Temu Mangga, dan Bawang Putih Pada Fungsi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Biology Science & Education*. Vol. 6 (1) 2252-858X
- Mulyati, Budi. 2020. Potensi Herbal dalam Pencegahan dan Penanganan Pasien Covid-19. *INDEPT*. Vol. 9 No. 1. ISSN 2087-9245
- Muslimin. 2014. *Pendidikan Agama Islam*. Yogyakarta: Deepublish
- Nadhira, Masayu. Riris L. Puspitasari, Karina F. Moegni, Imam Rosadi, Iis Rosliana. 2018. Profil *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) Pasien dengan Berbagai Usia Menggunakan *Flow Cytometry* di Klinik Hayandra. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*. Vol. 4 No. 4
- Nasser, Ghalib Abdul. 2020. Kunyit Sebagai Agen Anti Inflamasi. *Wellness and Healthy Magazine*. Vol. 2 (1) ISSN 2655-9951
- Nikkhoo, Maryam. Qasem Asgari. Mahmood Reza Mocin. Kambiz Yaghoobi. Abbas Gholipur. 2021. In Vitro and In Vivo Survey of Ethyl Acetate Extract of *Acorus calamus* (Sweet Flag) Rhizome on *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology Research*.
- Nitawati, N. P. M., D.M.C. Robin, M. Syafriadi. 2014. Respon Limfosit T Sitotoksik Pada Gingivitis Setelah Pemberian Kurkumin. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol. 2 (1): 42 - 49
- Nusantoro, YR. Fadlan A. 2020. Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADmET, dan Penambatan Molekular Isatinil-2-Aminobenzoimidrazon dan Kompleks Logam Transisi Co(II), Ni (II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kimindo*. Vol. 5 (2) DOI: <https://dx.doi.org/10.12962/j25493736.v5i2.7881>

- Pakki, E. Sumarheni. Aisyah, I.Safirahidzni, S. 2016. Formulasi Nanopartikel Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine Americana* (Aubl) Merr) dengan Variasi Konsentrasi Kitosan – Tripolifosfat (TPP). *Jurnal Trop. Pharm. Chem.* Vol. 3 (4)
- Pal, Sovan Lal. Utpal Jana. Manna. Mohanta. Manavalan. 2011. Nanoparticle: An Overview of Preparation and Characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* Vol. 1 (6)
- Perdana, Pende Gede Raditya Wira. 2022. Review: Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *Jurnal Farmagazine.* Vol. IX(1)
- Prasetiawati, Riska. Melia Suherman. Benny Permana. Rahmawati. 2021. Studi Molecular Docking Senyawa Antosianidin Terhadap Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Sebagai Anti Kanker Paru. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* Vol. 891): 8-20
- Pratoko, Dwi Koko. 2012. Molecular Docking Senyawa Fitokimia *Piper longum* (L.) Terhadap Reseptor Siklooksigenase-2 (COX-2) Sebagai Antiinflamasi. *Chem.Prog.* Vol. 5 (1)
- Prihantika, Sabrina. N. Kurniati, K. Y. Rahadiyanto, M. I. Saleh, Z. Hafy. F. S. Tanoerahardjo. J. Nugraha. E. M. Salim. 2019. Sekresi IFN- γ dan IL-10 Setelah Stimulasi Antigen Fusi ESAT-6-CFP-10 (EC610) pada Penderita TB Aktif dan TB Laten. *Biomedical Journal of Indonesia: Jurnal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.* Vol. 5 (3). DOI: <https://doi.org/10.32539/BJI.V5I3.8897>
- Puspitasari, Sagita Candra. Hendy Hendarto. Widjiati. 2017. Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) Terhadap Kadar *Interleukin-6* Mencit Model Endometriosis. *Jurnal Biosains Pascasarjana.* Vol. 19 (3)
- Putra, B., Azizah R.N., Nopriyanti, E.M. 2020. Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Herba Krokot (*Portulaca oleracea* L.) Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan dengan Parameter *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH). *Jurnal Farmasi Galenika: Galenika Journal of Pharmacy (e-Journal),* 6(1), 20-25. doi: 10.22487/j24428744.2020.v6.il.14106
- Qonitannisa, Shofi. Ahmad Fadli. Sunarno. 2020. Sintesis Nanokitosan dengan Metode Gelasi Ionik Menggunakan Pelarut Asam Asetat dengan Variasi Konsentrasi Kitosan. *Jom FTEKNIK.* Vol. 7 (2)
- Ravichandiran, Vellayutham & Patil Vishal S. 2015. In Vitro Evaluation for Immunomodulatory Activity of *Acorus calamus* on Human Neutrofil. *International Research Journal of Pharmacy.* Vol. 6 (7)
- Razali, Mutiara Fahmi. 2021. Penggunaan Manusia Sebagai Relawan dalam Uji Coba Obat Baru: *Kajian Al-Qur'an, Hadits, dan Kaedah Fiqih.* *El-Usrah: Jurnal Hukum Keluarga.* Vol. 4 No. 1
- Roffico, M. Sasmito Djati. 2014. Efektivitas Pemberian Ekstrak Ethanol Daun *Polyscias obtuse* dan *Elephantopus scaber* Terhadap Modulasi Sel T CD4+ dan CD8+ pada Mencit Bunting BALB/c. *Jurnal Biotropika.* Vol. 2 (3)
- Rosdianto, Aziiz Mardanarian. Wasmen Manalu. Hera Maheswari. 2016. Profil Hematologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus* sp.) Betina Setelah Pemberian Jamu Kesuburan. *Jurnal Farmasi Indonesia.* Vol. 8 (1)

- Ruslin, Nindy Rachma, Mesi Leorita. 2020. Desain Turunan Senyawa Leonurine Sebagai Kandidat Obat Antiinflamasi. *Jurnal Farmasi Galenika*. Vol. 6 (1): 181-191. ISSN: 2442-8744. DOI: 10.22487/j24428744.2020.v6.il.15025
- Sagitasa, Salsa, K. Elizabeth, L. I. Sulaeman, A. Rafasafly, D. W. Syafira, A. Kristande, M. Muchtaridi. 2021. Studi In Silico Senyawa Aktif Daun Singawalang (*Petiveria alliacea*) Sebagai Penurun Kadar Glukosa Darah Untuk Pengobatan Penyakit Diabetes Melitus Tipe-2. *Chimica et Natura Acta*. Vol. 9 (2): 58-66
- Sapri. E. Siswanto S, A. Yulianti. 2017. Uji Aktivitas Antiinflamasi Fraksi Air Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) Pada Mencit Jantan. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. Vol. 2 (1): 60-67
- Sari, Silvia Permata dan Imam Adi Wicaksono. 2016. Artikel Review: Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi, dan Isolat Rimpang (*Curcuma* sp.) Terhadap Beberapa Bakteri Patogen. *Farmaka*. Vol 14 (1)
- Setiawan, Hartanto dan Mohammad Isa Irawan. 2017. Kajian Pendekatan Penempatan Ligan Pada Protein Menggunakan Algoritma Genetika. *Jurnal Sains dan Seni ITSi*. Vol. 6 (2) 2337-3520
- Shafia, Arina. R. Mujayanto, dan A. Feraanisa. 2020. Bay Leaf (*Syzygium polyanthum*) Extract Effect on IL-10 Expression in Oral Ulcer. *ODONTO Dental Journal*. Vol. 7 (1)
- Sharma, Vineet, Rohit Sharma DevNath Singh Gautam. Kamil Kuca. Eugenie Nepovimova. Natalia Martins. 2020. Role of Vacha (*Acorus calamus* Linn.) in Neurological and Metabolic Disorders: Evidence from Ethnopharmacology, Phytochemistry, Pharmacology, and Clinical Study. *Journal of Clinical Medicine*. Vol. 9 (1176)
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir al-Misbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Vol. 5*. Jakarta: Lentera Hati
- Smith, W.L. dan Langenbach, R. 2001. Why there are two cyclooxygenase isozymes. Dalam Perspective Series: Prostaglandins and Precursors. The Journal of Clinical Investigation. 107(12):1491-1495
- Sulistiani, Ria Purnawian. Hesti Murwani Rahayuningsih. 2015. Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta* L. Schoot) Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nutrition College*. Vol. 4 (2): 409 – 415. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jnc>
- Susanty. Fairus Bachmid. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L.). *Konversi*. Vol. 5 (2)
- Syahputra G, L. Ambarsari, T. Sumaryada. 2014. Simulasi *Docking* Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika*. Vol. 10 (1)
- Tsalissavrina, Iva. A. Murdiati, S. Raharjo, Lily A. L. 2022. Distribusi Isoflavon dan Aktivitas Antioksidan pada Kecambah Koro Pedang Putih (*Canavalia ensiformis* L. (DC)). *Indonesian Journal of Human Nutrition*. Vol. 9 (2): 190-199. DOI:<https://doi.org/10.21776/ub.ijhn.2022.009.02.7>
- Voet, D. and Judith G.V. 2011. *Biochemistry* Fourth Edition. USA: John Wiley & Sons Inc

- Wang, J., Kong, M., Zhou, Z., Yan, D., Yu, X., Cheng, X., ... & Chen, X. (2017). Mechanism of surface charge triggered intestinal epithelial tight junction opening upon chitosan nanoparticles for insulin oral delivery. *Carbohydrate polymers*, 157, 596-602.
- Widyastuti, Rahma. Galuh Ratnawati. dan Saryanto. 2019. Penggunaan Tumbuhan Jeringau (*Acarus calamus*) Untuk Pengobatan Berbagai Penyakit Pada Delapan Etnis di Provinsi Aceh. *Media Konservasi*. Vol. 24 (1)
- Yu, Jie, X. Bi, B. Yu, D. Chen. 2016. Isoflavones: Anti-Inflammatory Benefit and Possible Caveats. *Nutrients*. Vol. 8, 361. doi:10.3390/nu8060361
- Yuandani. Sony Eka Nugaraha. Lia Laila. Setia Dame Silaban, Fadhilah Ramdhani. 2020. Short Communication: Stimulatory effect of *Curcuma mangga* on immune response against *Staphylococcus aureus*. *Nusantara Bioscience*. Vol. 12 (2)
- Zhang, J.M, Liao, W., He Y. X. *et al.* 2013. Study on Intestinal Absorption and Pharmacokinetic Characterization of Diester Diterpenoid Alkaloids in Precipitation Derived from Fuzi-Gancao Herb-Pair Decoction for Its Potential Interaction Mechanism Investigation. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 147 (1)

Lampiran 1 : Alur Penelitian

Lampiran 2 : Data Hasil LCMS *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus*

No.	Senyawa	Molecular Formula	No.	Senyawa	Molecular Formula
1.	Dimethyl sulfide	C ₂ H ₆ S	61.	Galangin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
2.	Allyl mercaptan	C ₃ H ₆ S	62.	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
3.	Allyl methyl sulfide	C ₄ H ₈ S	63.	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
4.	Dimethyl disulfide	C ₂ H ₆ S ₂	64.	Diallyl hexasulfide	C ₆ H ₁₀ S ₆
5.	tropone	C ₇ H ₆ O	65.	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
6.	Diallyl sulfide	C ₆ H ₁₀ S	66.	Fisetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
7.	Methyl allyl disulfide	C ₄ H ₈ S ₂	67.	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
8.	Methyl propyl disulfide	C ₄ H ₁₀ S ₂	68.	y-glutamyl-S-trans-1-propenyl-cysteine	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S
9.	Dimethyl trisulfide	C ₂ H ₆ S ₃	69.	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	C ₁₉ H ₁₆ O ₃
10.	2-vinyl-4-H-1,3-dithiin	C ₆ H ₈ S ₂	70.	N-trans-p-coumaroyloctopamine	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ O ₄
11.	azulene	C ₁₀ H ₈	71.	8(17),12-labdadiene-15,16-dial	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
12.	Diallyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	72.	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
13.	S-methyl 2-propene-1-thiosulfinate	C ₄ H ₈ O ₂ S	73.	Communic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
14.	camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	74.	Copallic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
15.	Dipropyl disulfide	C ₆ H ₁₄ S ₂	75.	Bis-demethoxycurcumin	C ₁₉ H ₁₆ O ₄
16.	Allicin	C ₆ H ₁₀ O ₂ S ₂	76.	Diallyl heptasulfide	C ₆ H ₁₀ S ₇
17.	Methiin	C ₄ H ₉ NO ₃ S	77.	myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
18.	(-) S-allyl-L-cysteine	C ₆ H ₁₁ NO ₂ S	78.	N-cis-feruloyltyramine	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₄
19.	Trans-S-(1-propenyl)-L-cysteine	C ₆ H ₁₁ NO ₂ S	79.	Leucocyanidin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
20.	p-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	80.	Isosinomenine	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₄
21.	2,5-dimethoxy-p-benzoquinone	C ₈ H ₈ O ₄	81.	N-trans-feruloyloctopamine	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₅
22.	methylisoeugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	82.	Zerumin B	C ₂₀ H ₃₀ O ₄
23.	Alliin	C ₆ H ₁₁ NO ₃ S	83.	demethoxycurcumin	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
24.	cycloalliin	C ₆ H ₁₁ NO ₃ S	84.	Lupiwighteone	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
25.	isoalliin	C ₆ H ₁₁ NO ₃ S	85.	Calcaratarin A	C ₂₂ H ₃₆ O ₃
26.	di-(2-propenyl)trisulfide / diallyl trisulfide / allyl trisulfide	C ₆ H ₁₀ S ₃	86.	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
27.	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	87.	Allithiamine	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₂ S ₂
28.	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	C ₆ H ₁₂ S ₃	88.	Curcumin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
29.	methylselenocysteine	C ₄ H ₉ NO ₂ Se	89.	S(2-carboxypropyl)glutathione	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₈ S
30.	Dimethyl diselenide	C ₂ H ₆ Se ₂	90.	Squalene	C ₂₉ H ₄₈

31.	Ferulic acid	C10H10O4	91.	Acoradin	C24H32O6
32.	2,4,5-trimethoxybenzaldehyde	C10H12O4	92.	Diosgenin	C27H42O3
33.	(-)-cadala-1,4,9-triene	C15H22	93.	Tigogenin	C27H44O3
34.	Calamene	C15H22	94.	B-amyrin	C30H50O
35.	Aristolene	C15H24	95.	Lupeol	C30H50O
36.	Calarene	C15H24	96.	Laxogenin	C27H42O4
37.	Aceteugenol	C12H14O3	97.	Gitogenin	C27H44O4
38.	isoasarone	C12H16O3	98.	B-chlorogenin	C27H44O4
39.	Beta-asarone	C12H16O3	99.	Reynoutrin	C20H18O11
40.	Diallyl tetrasulfide	C6H10S4	100.	Astragalin	C21H20O11
41.	Calamenol 1	C15H22O	101.	Quercetin-3-O-rhamnoside	C21H20O11
42.	Calamusenone	C15H22O	102.	Agigenin	C27H44O5
43.	Acolamone	C15H24O	103.	Hirsutrin	C22H22O11
44.	Acoragermacrone	C15H24O	104.	Myricetin 3-rhamnoside	C21H20O12
45.	Acorenone	C15H24O	105.	Isoquercitrin	C21H20O12
46.	Calacone	C15H24O	106.	Kaempferol 3-(2''-acetylramnoside)	C23H22O11
47.	Isoacolamone	C15H24O	107.	Kaempferol 3-(3''-acetylramnoside)	C23H22O11
48.	Isoshyobunone	C15H24O	108.	Kaempferol 3-(4''-acetylramnoside)	C23H22O11
49.	Preisocalamendiol	C15H24O	109.	Difurocumenonol	C29H34O7
50.	Shyobunon	C15H24O	110.	Curcumanggoside	C26H40O10
51.	Acorenol	C15H26O	111.	Kaempferol 3-(2'',4''-diacetylramnoside)	C25H24O12
52.	1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-one	C12H16O4	112.	Kaempferol 3-(3'',4''-diacetylramnoside)	C25H24O12
53.	Isoacoramone	C12H16O4	113.	Rutin	C27H30O16
54.	Sinapic acid	C11H12O5	114.	Myricetin 3-rutinoside	C27H30O17
55.	Acoronene	C15H22O2	115.	Soyacerebroside I	C40H75NO9
56.	Acorone	C15H24O2	116.	Eruboside B1 / Isoeruboside	C51H84O24
57.	Calamendiol / Isocalamendiol	C15H26O2	117.	Sativoside-R2	C56H92O27
58.	Ajoene	C9H14OS3	118.	Sativoside-R1	C62H104O33
59.	Allyl pentasulfide	C6H10S5	119.	Sativoside-B1	C63H106O35
60.	Acoric acid	C15H24O4			

Lampiran 3 : Data Jumlah Relatif Sel T CD4⁺TNF- α Pada Masing-Masing Perlakuan

Perlakuan	Ulangan						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
K-	0,26	0,48	0,55	0,32	0,92	1,17	0,6167	0,356801
K+	0,89	0,54	0,48	2,26	1,46	1,18	1,1350	0,665785
P1	0,11	0,26	0,1	0,24	0,65	1,04	0,4000	0,37186
P2	0,14	0,03	0,02	0,08	0,07	0,02	0,0600	0,046904
P3	1,52	0,08	0,08	0,06	0,06	0,26	0,3433	0,581504
Jumlah	2,92	1,39	1,23	2,96	3,16	3,67	2,555	2,022854

Keterangan: K - = aquadest, K + = cisplatin + ekstrak nanopartikel 0 mg/kgBB, P1 = cisplatin + ekstrak nanopartikel 25 mg/kgBB, P2 = cisplatin + ekstrak nanopartikel 50 mg/kgBB, P3 = cisplatin + jamu 75 mg/kgBB

Lampiran 4 : Data Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN- γ Pada Masing-Masing Perlakuan

Perlakuan	Ulangan						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
K-	0,62	1,3	1,53	0,87	2,3	3,27	1,648333333	0,985199
K+	2,36	1,91	2,25	3,65	3,05	2,43	2,608333333	0,630822
P1	0,29	0,52	0,33	0,88	2,39	2,14	1,091666667	0,935851
P2	1,3	0,3	0,11	0,13	0,16	0,5	0,416666667	0,456713
P3	2,27	1,44	1,28	0,2	1,24	2,23	1,443333333	0,763693
Jumlah	6,84	5,47	5,5	5,73	9,14	10,57	7,208333333	3,772277

Keterangan: K - = aquadest, K + = cisplatin + ekstrak nanopartikel 0 mg/kgBB, P1 = cisplatin + ekstrak nanopartikel 25 mg/kgBB, P2 = cisplatin + ekstrak nanopartikel 50 mg/kgBB, P3 = cisplatin + jamu 75 mg/kgBB

Lampiran 5 : Data Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IL-10 Pada Masing-Masing Perlakuan

Perlakuan	Ulangan						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
K-	1,32	2,57	0,45	0,68	2,03	1,46	1,418333333	0,799335
K+	0,42	0,22	0,2	0,55	0,28	0,24	0,318333333	0,138046
P1	0,3	1,3	0,38	1,31	1,46	1,91	1,11	0,636805
P2	0,34	0,93	1,53	1,25	1,72	1,16	1,155	0,48657
P3	1,04	0,54	1,21	0,65	0,81	0,74	0,831666667	0,250393
Jumlah	3,42	5,56	3,77	4,44	6,3	5,51	4,833333333	2,311148

Keterangan: K - = aquadest, K + = cisplatin + ekstrak nanopartikel 0 mg/kgBB, P1 = cisplatin + ekstrak nanopartikel 25 mg/kgBB, P2 = cisplatin + ekstrak nanopartikel 50 mg/kgBB, P3 = cisplatin + jamu 75 mg/kgBB

Lampiran 6 : Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel T CD4⁺TNF- α

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	1.07818343
	Most Extreme Differences	
	Absolute	.125
	Positive	.125
	Negative	-.065
Test Statistic		.125
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,200 > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Nilai (Y)	Based on Mean	1.418	4	25	.257
	Based on Median	.352	4	25	.840
	Based on Median and with adjusted df	.352	4	9.631	.837
	Based on trimmed mean	1.187	4	25	.341

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,257 > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data bersifat homogen.

3. Uji ANOVA

ANOVA

Y

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.866	4	.967	4.606	.006
Within Groups	5.246	25	.210		
Total	9.112	29			

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,006 < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terhadap jumlah relative sel T CD4⁺TNF- α mencit yang diinduksi cisplatin. Data dilanjutkan ke uji lanjut, yaitu uji Duncan.

4. Uji Duncan

Y

Duncan^a

X	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	6	.0600	
5	6	.3433	
3	6	.4000	
1	6	.6167	.6167
2	6		1.1350
Sig.		.064	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Interpretasi = Hasil analisis menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah relative sel T CD4⁺TNF- α pada kelompok K+. Seluruh kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah relative sel T CD4⁺TNF- α yang berbeda nyata dengan kelompok K+ dan tidak berbeda nyata dengan kelompok K-.

Lampiran 7 : Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN- γ

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	.95739256
	Most Extreme Differences	
	Absolute	.155
	Positive	.155
	Negative	-.097
Test Statistic		.155
Asymp. Sig. (2-tailed)		.063 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah 0,063 > 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Nilai (Y)	Based on Mean	1.310	4	25	.294
	Based on Median	.693	4	25	.604
	Based on Median and with adjusted df	.693	4	21.758	.605
	Based on trimmed mean	1.228	4	25	.324

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah 0,294 > 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data bersifat homogen.

3. Uji ANOVA

ANOVA

Nilai (Y)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.462	4	3.865	6.366	.001
Within Groups	15.181	25	.607		
Total	30.643	29			

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,001 < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terhadap jumlah relative sel T $CD4^+IFN-\gamma$ mencit yang diinduksi cisplatin. Data dilanjutkan ke uji lanjut, yaitu uji Duncan.

4. Uji Duncan

Nilai (Y)

Duncan^a

Perlakuan (X)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	6	.4167		
3	6	1.0917	1.0917	
5	6		1.4433	
1	6		1.6483	
2	6			2.6083
Sig.		.146	.254	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Interpretasi = Hasil analisis menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah relative sel T $CD4^+IFN-\gamma$ pada kelompok K+. Seluruh kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah relative sel T $CD4^+IFN-\gamma$ yang berbeda nyata dengan kelompok K+. Perlakuan P1 dan P3 tidak berbeda nyata dengan kelompok K-, sedangkan perlakuan P2 berbeda nyata dengan kelompok K-.

Lampiran 8 : Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IL-10

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	.61415094
	Most Extreme Differences	
	Absolute	.128
	Positive	.128
	Negative	-.096
Test Statistic		.128
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,200 > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Nilai (Y)	Based on Mean	2.457	4	25	.072
	Based on Median	1.477	4	25	.239
	Based on Median and with adjusted df	1.477	4	8.961	.287
	Based on trimmed mean	2.172	4	25	.101

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,294 > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data bersifat homogen.

3. Uji ANOVA

ANOVA

Nilai (Y)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.191	4	1.048	3.844	.014
Within Groups	6.815	25	.273		
Total	11.006	29			

Interpretasi = Nilai signifikansi yang didapatkan adalah $0,014 < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* terhadap jumlah relative sel T CD4⁺IL-10 mencit yang diinduksi cisplatin. Data dilanjutkan ke uji lanjut, yaitu uji Duncan.

4. Uji Duncan

Nilai (Y)

Duncan^a

Perlakuan (X)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	6	.3183	
5	6	.8317	.8317
3	6		1.1100
4	6		1.1550
1	6		1.4183
Sig.		.101	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Interpretasi = Hasil analisis menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah relative sel T CD4⁺IL-10 pada kelompok K+. Seluruh kelompok perlakuan mengalami peningkatan jumlah relative sel T CD4⁺IL-10. Perlakuan P3 tidak berbeda nyata dengan kelompok K+. Perlakuan P1 dan P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok K- dan berbeda nyata dengan kelompok K+.

Lampiran 9 : Perhitungan Dosis

1. Dosis Perlakuan Pemberian Nanopartikel Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, dan *Acorus calamus*

Penentuan dosis nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* mengacu pada penelitian sebelumnya, Muchtaromah dkk (2017) yang menyatakan bahwa penggunaan optimal ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* adalah pada dosis 50 mg/kgBB sehingga pada penelitian ini diambil dosis 50 mg/kgBB dan rentang di bawahnya yaitu 25 mg/kgBB. Pemilihan dosis di bawah dosis optimal didasarkan pada hipotesis penelitian di mana pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* dosis rendah diharapkan dapat mempengaruhi parameter.

Berikut adalah perhitungan pemberian nanopartikel *A. sativum*, *C. mangga*, dan *A. calamus* pada mencit:

a. Perhitungan Dosis 25 mg/kgBB

$$\text{Perhitungan} = \frac{\text{Berat badan mencit}}{1000} \times \text{Dosis}$$

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20}{1000} \times 25 = 0,5 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25}{1000} \times 25 = 0,625 \text{ mg}$$

b. Perhitungan Dosis 50 mg/kgBB

$$\text{Perhitungan} = \frac{\text{Berat badan mencit}}{1000} \times \text{Dosis}$$

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20}{1000} \times 50 = 1 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25}{1000} \times 50 = 1,25 \text{ mg}$$

2. Dosis Perlakuan Pemberian Jamu Subur Kandungan

Penentuan dosis jamu subur kandungan mengacu pada penelitian sebelumnya, Muchtaromah dkk (2017) yaitu 75 mg/kgBB. Dosis jamu subur kandungan perkapsul yaitu 500 mg/kgBB yang diminum 8 kapsul/hari (2x sehari @4 kapsul) dan dihitung menggunakan faktor konversi 0,018 sehingga diperoleh perhitungan sebagai berikut:

$$500 \text{ mg/kgBB} \times 8 = 4000 \text{ mg/kgBB}$$

$4000 \text{ mg/kgBB} \times 0,018 = 72 \text{ mg/kg BB}$, kemudian dibulatkan dengan menaikkan dosis menjadi 75 mg/kgBB

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20}{1000} \times 75 = 1,5 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25}{1000} \times 75 = 1,9 \text{ mg}$$

3. Dosis Perlakuan Pemberian Cisplatin

Penentuan dosis cisplatin mengacu pada penelitian sebelumnya, Muchtaromah dkk (2017) yaitu $0,5 \text{ mL/kgBB}$ sehingga diperoleh perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20}{1000} \times 0,5 = 0,01 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25}{1000} \times 0,5 = 0,0125 \text{ mL}$$