

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
DARI FRAKSI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack) SERTA
STUDI POTENSI ANTIINFLAMASI SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

(skripsi)

Oleh :

**Ofriani Fatrika
1857011003**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack) SERTA STUDI POTENSI ANTIINFLAMASI SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

Oleh

Ofriani Fatrika

Tumbuhan Sungkai (*Peronema canescens* Jack) terutama bagian daun sungkai sering dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional, rebusan daun sungkai sering digunakan untuk meningkatkan imunitas tubuh, menurunkan demam, menurunkan kadar asam urat, sebagai obat antimalaria, antivirus dan antibakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi daun sungkai serta kajian potensi antiinflamasi secara *in vitro* dan *in silico*. Tahapan penelitian meliputi maserasi, partisi, uji antiinflamasi secara *in vitro*, isolasi menggunakan metode kromatografi cair vakum, kromatografi kolom, dan kromatografi lapis tipis. Karakterisasi senyawa menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LCMS/MS). Kajian secara *in silico* dilakukan dengan metode *molekuler docking* menggunakan *AutoDock Vina*.

Berdasarkan uji antiinflamasi secara *in vitro*, fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dari fraksi *n*-heksana dan fraksi diklorometana, nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 52,12 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil analisis LCMS/MS didapatkan rumus molekul $C_{16}H_{12}O_5$ diduga sebagai senyawa flavonoid yaitu acacetin dan diberi kode NV37. Uji antiinflamasi secara *in silico*, hasil *docking* senyawa NV37 terhadap reseptor 3LN1 dan 5KIR berhasil membentuk ikatan dengan diperolehnya nilai afinitas ikatan sebesar -8,78 kkal/mol dan -6,16 kkal/mol. Nilai afinitas ikatan yang negatif menandakan bahwa senyawa NV37 memiliki potensi sebagai inhibitor enzim COX-2.

Kata kunci : Daun sungkai, flavonoid, *in silico*, inflamasi, *molecular docking*.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITE COMPOUNDS FROM SUNGKAI LEAVES FRACTIONS (*Peronema canescens* Jack) AND STUDY OF IN VITRO AND IN SILICO ANTIINFLAMMATORY POTENTIAL

By

Ofriani Fatrika

The Sungkai plant (*Peronema canescens* Jack), especially the sungkai leaves, is often used by Indonesian people as traditional medicine. Decoction of sungkai leaves is often used to increase body immunity, reduce fever, reduce uric acid levels, as an antimalarial, antiviral and antibacterial drug.

This research aims to isolate and identify secondary metabolite compounds from sungkai leaves fractions as well as study antiinflammatory potential in vitro and in silico. The research stages included maceration, partitioning, in vitro antiinflammatory testing, isolation using vacuum liquid chromatography, column chromatography and thin layer chromatography. Compound characterization using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS/MS). In silico studies were carried out using the molecular docking method using AutoDock Vina.

Based on in vitro antiinflammatory tests, the ethyl acetate fraction had better antiinflammatory activity than the *n*-hexane fraction and the dichloromethane fraction, the IC₅₀ value obtained was 52.12 µg/mL. Based on the results of LCMS/MS analysis, it was found that the molecular formula C₁₆H₁₂O₅ was thought to be a flavonoid compound, namely acacetin and was given the code NV37. In silico antiinflammatory tests, the docking results of the NV37 compound against the 3LN1 and 5KIR receptors succeeded in forming bonds with binding affinity values of -8.78 kcal/mol and -6.16 kcal/mol. Negative binding affinity value indicates that the NV37 compound has potential as a COX-2 enzyme inhibitor.

Key words: Sungkai leaves, flavonoids, in silico, inflammation, molecular docking.

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
DARI FRAKSI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack) SERTA
STUDI POTENSI ANTIINFLAMASI SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

Oleh

Ofriani Fatrika

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI
DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack)
SERTA STUDI POTENSI ANTIINFLAMASI
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

Nama Mahasiswa : **Ofriani Fatrika**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1857011003**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



Prof. Noviany, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP 197311191998022001

Dr. Setyanto Tri Wahyudi, M.Si.
NIP 197607312005011003

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

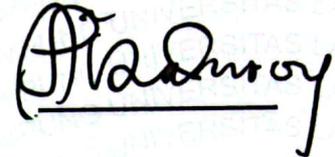
Dr. Mita Rilyanti, M.Si.
NIP 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua

: **Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.**



Sekretaris

: **Dr. Setyanto Tri Wahyudi, M.Si.**



Penguji

Bukan Pembimbing

: **Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si
NIP 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 22 Juli 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ofriani Fatrika
NPM : 1857011003
Jurusan : Kimia
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi saya berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Daun Sungkai (*Peronema Canescens* Jack) Serta Studi Potensi Antiinflamasi Secara *In Vitro* dan *In Silico*”** adalah benar karya saya sendiri baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Saya tidak keberatan apabila data dalam skripsi saya digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan kedua belah pihak.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sadar untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 22 Juli 2024

Pembuat Pernyataan



Ofriani Fatrika
NPM 1857011003

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Baturaja pada tanggal 13 Oktober 1999, sebagai anak perempuan bungsu (ketiga) dari empat bersaudara dari pasangan bapak Syaiful Anwar dan Ibu Nurlela wati (almh). Penulis mengenyam dan menyelesaikan pendidikan formal mulai dari Taman Kanak-kanak (TK) ‘Aisyiyah Bustanal Athfal pada tahun 2005, dilanjutkan di SD N 158 OKU hingga kelas 5 dan menyelesaikan pendidikan kelas 6 di SD N 5 Tanjung Aman, Kota Bumi pada tahun 2011, menyelesaikan pendidikan di SMP N 40 OKU 2014, dan SMA N 5 OKU pada tahun 2017. Pada tahun 2018 penulis diterima di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri Wilayah Barat (SMMPTN-Barat).

Penulis pernah aktif sebagai anggota karate Lembaga Karate-Do Indonesia (LEMKARI) saat duduk di bangku SMP. Memasuki pendidikan SMA penulis aktif dalam organisasi pasukan pengibar bendera sekolah (PASKIBRA) sebagai bendahara umum dan anggota OSIS. Memasuki perkuliahan penulis aktif mengikuti unit kegiatan mahasiswa (UKM) yaitu menjadi anggota di organisasi Rohani Islam (ROIS) sebagai anggota kemuslimahan, Mengikuti UKM Fakultas Natural sebagai anggota redaksi sejak tahun 2018 hingga 2020 dan Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada tahun 2018. Menjadi anggota aktif bidang Kaderisasi di HIMAKI pada tahun 2019 hingga 2020. Penulis juga aktif dalam organisasi eksternal kampus yaitu Pergerakan Mahasiswa Islam Indonesia (PMII) sejak 2018 dan menjadi wakil ketua kaderisasi 1 sejak 2019 hingga 2020.

Penulis juga pernah mengikuti Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) skema PKM-PE dan meraih pendanaan pada tahun 2020.

Selama menempuh perkuliahan penulis aktif menjadi asisten praktikum kimia organik di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung. Penulis menjadi asisten Praktikum Kimia Organik untuk kelas biologi pada tahun 2020 dan 2021. Praktikum Kimia Organik I pada tahun 2021. Praktikum Kimia Organik II dan Fisik I pada tahun 2022. Praktikum Kimia Organik III dan Analitik pada tahun 2022.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji Syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya
Tulisan sederhana ini penulis persembahkan kepada

Kedua orang tua

Kepada ayahanda tercinta yang senantiasa dengan tulus
mempercayai dan mendukung penulis hingga akhir.

Kepada Ibunda yang telah bahagia di surga dan ucapan terima kasih
penulis sampaikan kepada ibu yang kini kebersamai.
Ayuk-ayuk penulis icak inga yang terkasih serta adik tercinta martin
yang kini sudah dewasa. Terima kasih atas semua dukungan dan
semangat.

Ucapan terima kasih dengan tulus penulis sampaikan kepada **Prof.
Dr. Noviany, S.Si., M.Si., Dr. Setyanto Tri Wahyudi, M.Si., dan
Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.** yang telah membimbing, memberikan
ilmu, saran serta masukannya selama menempuh pendidikan
dikampus.

Kepada teman-teman yang senantiasa kebersamai, memberikan
keceriaan, motivasi, ilmu, dan semangat.

Almamater tercinta
Universitas Lampung

Motto

Allah tidak membebani seseorang
melainkan sesuai dengan kesanggupannya
(QS. Al-Baqarah:286)

Maka, nikmat Tuhanmu
manakah yang kamu dustakan?
(QS. Ar-Rahman:13)

Selalu ada Allah
untuk orang-orang yang sabar dan tawakal
(Ofriani Fatrika)

Sanwacana

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillahirobbil'alamin. Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas berkat rahmat dan kasih sayang penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Daun Sungkai (*Peronema Canescens* Jack) Serta Studi Potensi Antiinflamasi Secara *In Vitro* dan *In Silico*”** sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Sholawat dan salam tidak lupa penulis haturkan kepada baginda nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, dan para pengikutnya hingga akhir zaman.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini, banyak pihak yang turut memberikan semangat dan arahan. Dengan segala rasa syukur dan ucapan terima kasih penulis haturkan kepada :

1. Ayahanda Syaiful Anwar dan ibunda tersayang atas curahan kasih sayang, do'a, dan nasehat yang berharga. Ucapan terima kasih juga penulis tuliskan kepada icak, inga, dan adikku martin atas semua semangat dan pelajaran hidup yang penulis dapatkan.
2. Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik sekaligus Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang memberikan berbagai masukan dan motivasi sejak awal perkuliahan hingga selesai.

3. Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si. selaku pembimbing utama atas kesediaannya dalam memberikan ilmu, bimbingan, motivasi, kritik, dan saran selama proses penyelesaian skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan.
4. Dr. Setyanto Tri Wahyudi S.Si., M.Si. selaku pembimbing kedua atas kesediaan dan kesabarannya dalam memberikan ilmu, bimbingan, motivasi, dukungan, dan saran selama penyelesaian skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan.
5. Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku pembahas yang telah memberikan masukan, kritik, dan saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan.
6. Dr. Mita Ruliyanti, M.Si. selaku ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Lampung.
7. Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan limpahan ilmu selama penulis belajar di urusan Kimia. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan Bapak dan Ibu.
9. Para Staf dan Laboran Jurusan Kimia FMIPA Unila, Pak Rudi, Bu Endang, Mba Yuni, Mas Nomo, Mba Wit dan Mba Della atas segala bantuan yang diberikan kepada penulis.
10. Teman-teman *Noviany's Research* 2018, Rista, Reni, Wulandari terima kasih atas kebersamaannya selama bekerja di Laboratorium Organik.
11. Kakak-kakak *Noviany's Research Group* : Kak Arif, Kak Hanif, Mba Habibah, Mba Uswatun, Mba Isna, Mba Dhita, Mba Feni, Mba Azizah, Mba Aul dan kakak-kaka yang lainnya. Terimakasih banyak atas ilmu, dukungan dan semangatnya.
12. Adik-adik *Noviany's Research Group* : Jihan, Devi, Syaidah, Vier, Anatasya, Dilla, Siti, Icik, Vio, Govin, Inggit dan Julia
13. Kakak-kakak Lab. Kimia Organik dan Biokimia : Kak Arif, Kak Hanif, Kak Hendri, Bang Jeremia, Mba Rinda, Mba Aulia, Mba Kartika, Mba Ramy, Mba Azizah, yang telah banyak membantu penulis. Terimakasih banyak atas ilmu, dukungan dan semangatnya

14. Teman-teman Laboratorium Organik : Rista, Reni, wulan, Antin, Armi, Andi, Farah, Faliha, Andika, Ikhsan, Jihan, Devi, Syaidah, Havier, Bayu, Rizky, Kania, Akmal, Ara. Terimakasih atas bantuan, ilmu, semangat dan dukungannya kepada penulis.
15. Teman-teman kelas C dan *chemistry 18* yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, terimakasih atas kebersamaan, pengalaman, motivasi serta dukungan kepada penulis selama perkuliahan. Kimia 18... Totalitas, Berkualitas, Tanpa Batas.
16. Almamater tercinta Universitas Lampung.
17. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi ini
18. *Last but not least*, terima kasih kepada Ofriani Fatrika yang tetap tersenyum dalam segala hal yang kurang menyenangkan, terima kasih telah menyayangi dirimu sebaik ini. Aku bangga kepada mu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, namun penulis berharap melalui tulisan ini, penulis dapat memberikan manfaat dan berguna bagi orang lain. TERIMA KASIH.

Bandar Lampung, 22 Juni 2024

Penulis

Ofriani Fatrika

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sungkai (<i>Peronema canescens</i> Jack).....	4
2.2 Senyawa Metabolit Sekunder dari Sungkai	6
2.3 Senyawa Metabolit Sekunder	8
2.4 Inflamasi	10
2.5 Antiinflamasi	11
2.6 Siklooksigenase-2 (COX-2)	12
2.7 Pengujian Aktivitas Antiinflamasi Secara <i>In Vitro</i> menggunakan Metode Denaturasi Protein	12
2.8 Metode Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder.....	13
2.8.1 Isolasi	13
2.8.2 Ekstraksi	14
2.8.3 Kromatografi.....	15
2.9 Karakterisasi Senyawa Secara Spektroskopi	17
2.9.1 <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LCMS/MS).....	17
2.10 Studi <i>In Silico</i>	19
2.10.1 <i>Molecular Docking</i>	19
2.10.2 Perangkat Lunak	20
2.10.3 Sumber Informasi Data.....	22
III. METODE PENELITIAN	23
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
3.2 Alat dan Bahan	23
3.3 Prosedur Penelitian	24

3.3.1	Persiapan Sampel.....	24
3.3.2	Ekstraksi Sampel	24
3.3.3	Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara <i>In Vitro</i> dengan Metode Denaturasi Protein	25
3.3.4	Kromatografi Cair Vakum (KCV).....	26
3.3.5	Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	27
3.3.6	Kromatografi Kolom (KK).....	27
3.3.7	Identifikasi Senyawa menggunakan <i>Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (LCMS/MS)	28
3.3.8	Uji Potensi Antiinflamasi Secara <i>In Silico</i> Menggunakan Metode <i>Molecular Docking</i>	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		30
4.1	Persiapan Sampel.....	30
4.2	Ekstraksi	30
4.3	Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara <i>In Vitro</i>	32
4.4	Kromatografi Cair Vakum (KCV).....	34
4.5	Kromatografi Kolom (KK).....	36
4.6	Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi.....	41
4.6.1	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (LCMS/MS)	41
4.7	Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara <i>In Silico</i>	45
4.7.1	<i>Re-docking</i> : Validasi <i>Docking</i> COX-2 Terhadap Ligan Natifnya (PDB ID 3LN1)	46
4.7.2	<i>Re-docking</i> : Validasi <i>Docking</i> COX-2 Terhadap Ligan Natifnya (PDB ID 5KIR).....	48
4.7.3	<i>CrossDock</i> : Validasi <i>Docking</i> NV37 Pada Reseptor 3LN1 dan 5KIR.....	50
V. KESIMPULAN DAN SARAN		54
5.1	Kesimpulan.....	54
5.2	Saran	55
DAFTAR PUSTAKA		56
LAMPIRAN.....		62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nilai IC ₅₀ Dari Fraksi Daun Sungkai dan Natrium Diklofenak	33
2. Kategori Aktivitas Antiinflamasi	34
3. Fraksi Gabungan Hasil KCV Fraksi Etil Asetat.	35
4. Fraksi Gabungan Hasil KK Fraksi C	37
5. Fraksi Gabungan Hasil KK Fraksi D	39
6. Fraksi Gabungan Hasil KK Fraksi A	40
7. Senyawa Hasil Isolasi	43
8. Informasi Makromolekul 3LN1 dan 5KIR	46
9. Data Hasil Docking Reseptor 3LN1 dengan Ligan	51
10. Data Hasil Docking Reseptor 5KIR dengan Ligan	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman Sungkai.....	5
2. Struktur Senyawa Diterpen dari Daun Sungkai	7
3. Struktur Senyawa Flavonoid dari Daun Sungkai.....	8
4. Struktur Senyawa Bifenil dari Daun Turi.	9
5. Struktur <i>Sesbigrandiflorain</i> A, B, dan C.....	9
6. Perbedaan Fungsi Scoring dan Pencarian Algoritma Pada <i>AutoDock 4</i> dan <i>AutoDock Vina</i>	21
7. Proses Ekstraksi	31
8. Kromatogram Hasil KCV Fraksi Etil Asetat.....	36
9. Kromatogram Fraksi Gabungan Hasil KK Fraksi C.....	37
10. Kromatogram C5.....	38
11. Kromatogram Fraksi Gabungan Hasil KK Fraksi D.....	39
12. Kromatogram Fraksi Gabungan Hasil KK Fraksi A.....	40
13. Tampilan KLT pada UV254 nm (a) A3; (b) C5; (c) D10.....	41
14. Kromatogram Fraksi A3	41
15. Kromatogram Fraksi C5.....	42
16. Kromatogram Fraksi D10.	43
17. Prediksi Struktur Senyawa Hasil Isolasi Daun Sungkai..	45
18. Reseptor 3LN1 Dengan Ligan Natifnya	47
19. Struktur (a) Resepor 3LN1 (b) Ligan CEL	47
20. Reseptor 5KIR Dengan Ligan Natifnya.....	49
21. Struktur (a) Resepor 5KIR (b) Ligan RCX.....	49

I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang terletak di kawasan tropis, memiliki 25% *spesies* tumbuhan berbunga di dunia dan menjadikan Indonesia sebagai negara ketujuh yang memiliki tingkat kekayaan tumbuhan yang tinggi dengan jumlah *spesies* mencapai 20.000 jenis, 40% diantaranya merupakan tumbuhan endemik. Tumbuhan endemik memiliki banyak kegunaan seperti bahan pangan, papan, tanaman hias, dan obat tradisional. Ada 9,609 jenis tumbuhan di Indonesia, diduga memiliki khasiat sebagai obat dan lebih dari 940 jenis tumbuhan telah digunakan sebagai obat tradisional (Yassir dan Asnah, 2018). Data tersebut menunjukkan masih banyaknya potensi tumbuhan yang belum diketahui manfaat dan kegunaannya terutama sebagai bahan baku obat herbal. Salah satu parameter dalam pencarian sumber obat baru dapat dilakukan dengan melihat aktivitas biologis yang muncul, salah satunya seperti aktivitas antiinflamasi yang berguna untuk menurunkan tingkat peradangan akibat infeksi.

Antiinflamasi atau anti radang merupakan obat yang digunakan untuk mengurangi peradangan. Inflamasi yang bersifat progresif dapat menimbulkan penyakit tertentu yang tidak diinginkan, apabila terjadi inflamasi secara terus-menerus atau kronis kemungkinan dapat menyebabkan kerusakan jaringan hingga menyebabkan munculnya masalah klinis lainnya. Inflamasi dapat diatasi dengan penggunaan obat sintesis, namun mahalnya harga dan banyaknya efek samping yang dapat ditimbulkan pada tubuh membuat masyarakat lebih memilih obat-obatan tradisional (Chen *et al.*, 2018). Salah satu tanaman yang hingga kini masih digunakan sebagai tanaman obat oleh masyarakat adalah daun sungkai.

Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) adalah bahan baku utama yang sering digunakan masyarakat untuk menurunkan demam. Menurut Yani and Putranto (2014) ekstrak daun muda sungkai yang disajikan dalam bentuk jamu memiliki beberapa kandungan senyawa seperti peronemin, sitosterol, isopropanol, diterpenoid, dan flavonoid yang saling bersinergi untuk meningkatkan jumlah leukosit dalam tubuh. Hal tersebut ditunjukkan dalam pengobatan kekebalan antara penggunaan ekstrak sungkai dengan imunos, pada dosis ekstrak daun sungkai dalam konsentrasi 0,567 mg/Kg (b/b) dapat meningkatkan jumlah leukosit mencapai 36% dibandingkan imunos yang hanya sebesar 23% saja. Selain itu, ekstrak daun sungkai dilaporkan memiliki keaktifan sebagai antimalaria dengan tingkat toksisitas yang rendah antara ekstrak aseton, etanol, dan air dengan masing-masing nilai IC_{50} sebesar $23,37 \pm 5,63$; $629,46 \pm 4,85$; dan $634,00 \pm 144,82$ $\mu\text{g/mL}$ serta indeks selektifitas yang meningkat yaitu 0,89; 16,46; 51,70 (Suwandi *et al.*, 2018).

Suatu senyawa yang berhasil diisolasi dari fraksi semi polar daun sungkai yang diberi nama senyawa NV21, telah berhasil dilakukan uji secara *in silico* dan dilaporkan bahwa senyawa tersebut memiliki potensi sebagai inhibitor SARS-CoV-2 Mpro, dengan membentuk ikatan antara ligan uji dengan reseptor dan menampilkan energi ikatan yang bernilai negatif sebesar -6,66 kkal/mol (Khasanah, 2021). Senyawa lainnya yang juga berhasil diisolasi dari fraksi polar daun sungkai yaitu senyawa acacetin, hasil *docking* menunjukkan adanya interaksi antara ligan uji dan reseptor dengan terbentuknya ikatan terhadap reseptor protein SARS-Cov-2 Mpro dengan nilai energi afinitas sebesar -8,21 kkal/mol terhadap reseptor protein 7CZ4 dan sebesar -2,48 kkal/mol terhadap reseptor protein 8DMA (Prabawani, 2023).

Bidang komputasi kini menawarkan metode *in silico* sebagai pelengkap metode *in vitro* dan *in vivo* yang lazim digunakan dalam proses penentuan dan pencarian senyawa obat baru. Rancangan obat dikembangkan melalui komputasi untuk menemukan konformasi ikatan ligan untuk target makromolekul struktur yang telah diketahui. Salah satu program komputasi yang digunakan yaitu *AutoDock*

yang merupakan program *docking* yang dirancang untuk memprediksi energi bebas dan konformasi ikatan struktur kimia secara tiga dimensi (Santoso, 2011).

Dari banyaknya kemungkinan aktivitas biologis yang dimiliki daun sungkai seperti hal-hal yang dijelaskan di atas, adanya pengaruh letak geografis, suhu, iklim, dan kesuburan tanah suatu wilayah dapat mempengaruhi kandungan senyawa kimia dalam tanaman (Agustina dkk., 2016) serta adanya perkembangan teknologi yang dapat membantu memaksimalkan proses pencarian jenis obat baru. Maka dari itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) yang diambil dari Desa Belimbing, Kecamatan Peninjauan Kabupaten Ogan Komering Ulu serta dilakukan kajian potensi antiinflamasi secara *in vitro* dan *in silico*.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi daun sungkai (*Peronema canescens* Jack).
2. Melakukan kajian potensi antiinflamasi dari senyawa hasil isolasi dengan *Molecular Docking*.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kandungan senyawa aktif pada daun sungkai (*P. canescens*) yang memiliki potensi sebagai inhibitor terhadap gejala-gejala inflamasi dan menjadi bukti ilmiah tambahan dalam memvalidasi khasiat yang ada pada daun sungkai.

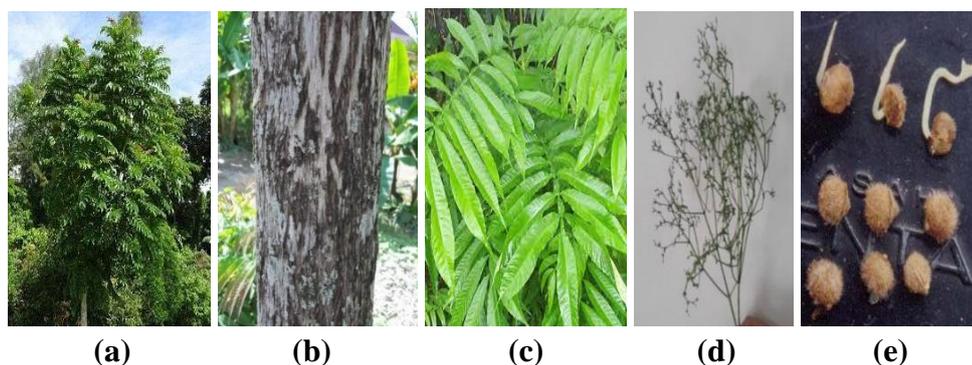
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sungkai (*Peronema canescens* Jack)

Sungkai secara alami terdapat di Pulau Kalimantan, Sumatera, Kepulauan Riau, dan Jawa Barat. Sungkai dapat tumbuh baik pada hutan-hutan sekunder terbuka dan di tepi sungai yang lembab. Dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 0-600 meter dari atas permukaan laut dengan curah hujan tahunan antara 2100-2700 mm. Pohon sungkai dapat tumbuh setinggi 20 hingga 30 meter dengan batangnya tumbuh tanpa cabang setinggi 15 meter atau lebih. Batang sungkai memiliki diameter sebesar 60 cm, batang lurus dan sedikit berlekuk dangkal, ranting pohon penuh dengan bulu halus, kulit luar batang sungkai berwarna kelabu atau sawo matang, beralur dangkal dan mengelupas kecil-kecil tipis. Tekstur kayu kasar, arah serat lurus, kadang-kadang bergelombang, Permukaan daun berbulu halus, dalam satu cabang terdapat lebih dari empat helai daun. Bunga sungkai berbentuk malai di ujung. Buah akan muncul setelah dua bulan musim bunga namun hanya 30% yang dapat digunakan sebagai bibit (Martawijaya dkk., 2005). Dalam taksonomi, tumbuhan ini diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Sub-kelas : *Asteridae*
Ordo : *Lamiales*
Famili : *Verbenaceae*
Genus : *Peronema*
Spesies : *Peronema canescens* (Plantamor, 2020).

Tanaman sungkai dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Sungkai; (a) Pohon; (b) Batang; (c) Daun; (d) Bunga; (e) Buah.

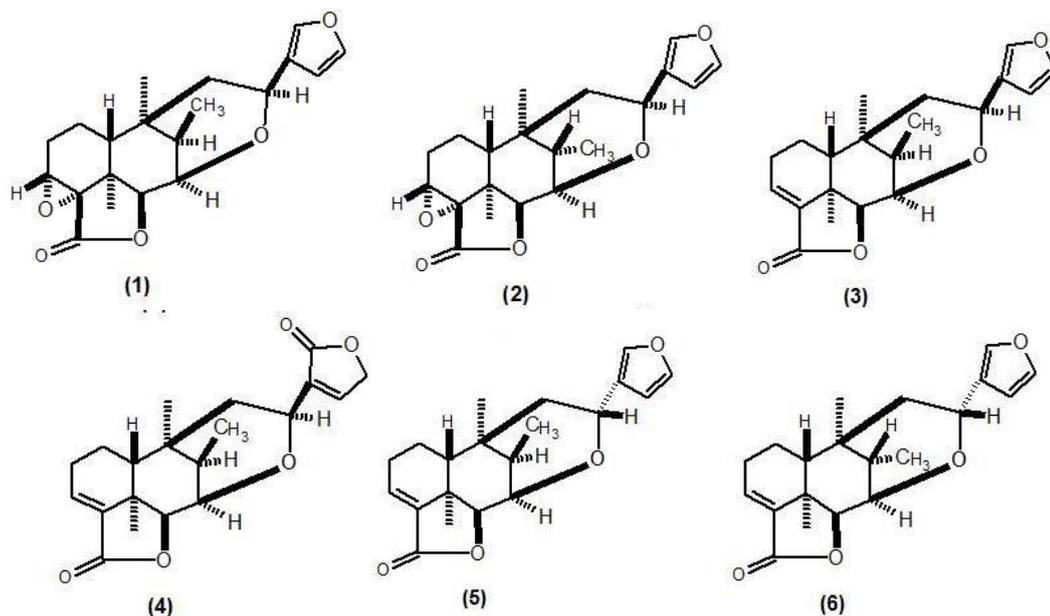
Tumbuhan sungkai digunakan oleh masyarakat sebagai tumbuhan obat. Beberapa daerah di Sumatera Selatan sering menggunakan daun muda sungkai sebagai penambah stamina, penurun demam, obat cacar, sakit gigi, malaria, hipertensi, dan kurap. Masyarakat biasa mengonsumsinya dengan cara merebus pucuk daun kemudian diminum. Masyarakat Dayak juga memanfaatkan daun sungkai untuk mengobati penyakit asam urat dengan cara mandi menggunakan air rebusan daun sungkai dan pada penyakit kurap dengan menyiramkan air rebusan pada bagian kulit yang gatal. Daun sungkai juga dimanfaatkan untuk pengobatan pada luka bakar dengan cara menghaluskan daun lalu dioleskan pada kulit yang terbakar. Rebusan daun muda sungkai juga dipercaya dapat memperlancar haid dan membantu meningkatkan kesuburan (Muharni dkk., 2022).

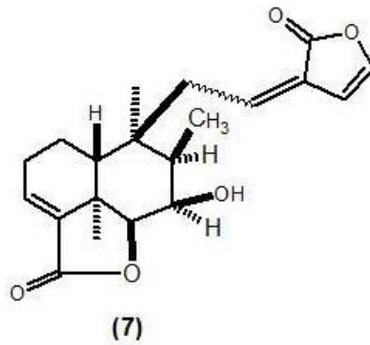
Berdasarkan penelitian Latief dkk (2021) ekstrak etanol daun sungkai memiliki aktivitas antihiperurisemia dengan menurunkan kadar asam urat darah mencit. Persentase penurunan aktivitas antihiperurisemia meningkat seiring dengan meningkatnya dosis yang digunakan. Aktivitas yang paling baik dalam menurunkan kadar asam urat terjadi pada dosis 500 mg/kgBB. Penelitian lain juga melaporkan bahwa ekstrak daun sungkai memiliki potensi yang besar sebagai antiplasmodium dengan tingkat toksisitas yang rendah (Suwandi *et al.*, 2018). Hasil isolasi dari ekstrak daun sungkai dengan pelarut *n*-heksana menghasilkan isolat B1 yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba terhadap bakteri gram

positif maupun bakteri gram negatif. Isolat hasil isolasi tersebut dilaporkan sebagai senyawa yang termasuk kedalam golongan senyawa terpenoid (Ningsih dkk., 2013). Ekstrak etanol daun sungkai memiliki aktivitas antibakteri yang baik dengan terbentuknya zona hambat pada pertumbuhan *E. coli*, zona hambat tertinggi diperoleh pada konsentrasi 100% ekstrak daun sungkai dan terendah pada konsentrasi 25%. Besarnya zona hambat yang terbentuk sebanding lurus dengan tingginya konsentrasi ekstrak yang digunakan (Fransisca dkk., 2020). Ekstrak daun sungkai memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 42,219 ppm. Nilai IC_{50} menunjukkan bahwa ekstrak daun sungkai tergolong antioksidan kuat (Fadlilaturrahmah dkk., 2022).

2.2 Senyawa Metabolit Sekunder dari Sungkai

Tujuh diterpenoid tipe *clorodane* yang telah berhasil diisolasi dari daun sungkai yang dilarutkan dalam aseton diberi nama Peronemin B₂ (1), A₂ (2), B₁ (3), C₁ (4), B₃ (5), A₃ (6), dan D₁ (7) disajikan pada Gambar 2.

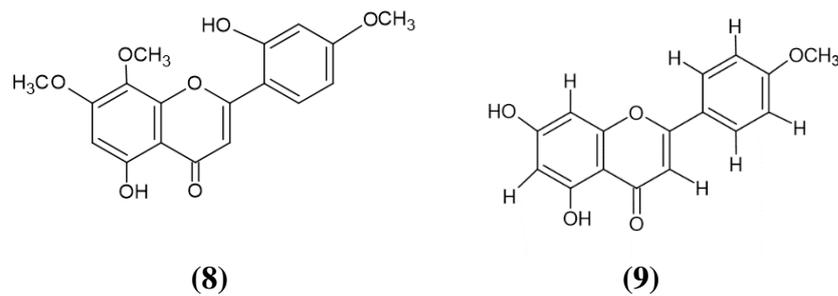




Gambar 2. Struktur Senyawa Diterpen dari Daun Sungkai.

Diantara diterpenoid tersebut, senyawa 4 dan 6 menunjukkan adanya penghambat terhadap aktivitas antimalaria (IC_{50} sebesar $13,1 \mu\text{M}$ pada senyawa 4 dan 83% penghambat pada $118 \mu\text{M}$ pada senyawa 6) terhadap proliferasi patogen malaria *Plasmodium falciparum* (Kitagawa *et al.*, 1994).

Senyawa flavonoid ter-glikolisasi yang berhasil diisolasi dan diberikan label nama ENV, dilaporkan memiliki sifat toksik dengan kadar yang terus menurun secara berturut-turut dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar $278,631 \mu\text{g/mL}$ dan $471,682 \mu\text{g/mL}$ (Hidayanti, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Khasanah (2021) memperoleh suatu senyawa flavonoid dengan memiliki struktur kerangka flavon dengan nama struktur 5,2'-dihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon (8). Dilihat dari hasil *docking*, Senyawa tersebut berhasil membentuk ikatan dengan protein SARS-CoV-2 Mpro dan menghasilkan energi ikatan sebesar $-6,66 \text{ kkal/mol}$ dengan konstanta inhibisi sebesar $12,64 \mu\text{M}$ dan dinyatakan memiliki potensi sebagai inhibitor protein SARS-CoV-2 Mpro. Penelitian dengan metode yang sama juga dilaporkan bahwa senyawa hasil isolasi dari fraksi polar daun sungkai yaitu senyawa 5,7-dihidroksi-2-(4-metoksifenil)kroman-4-on atau acacetin (9), memiliki potensi sebagai inhibitor SARS-CoV-2 Mpro. Senyawa tersebut berhasil membentuk ikatan pada protein target dan menghasilkan nilai energi ikatan $-8,21 \text{ kkal/mol}$ dengan konstanta inhibisi sebesar $663,92 \mu\text{M}$ (Prabawani, 2023). Struktur senyawa flavonoid hasil isolasi dari daun sungkai dapat dilihat pada Gambar 3.



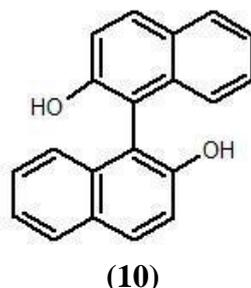
Gambar 3. Struktur Senyawa Flavonoid dari Daun Sungkai.

2.3 Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder awalnya didefinisikan sebagai zat dengan berat molekul yang rendah dan bukan merupakan produk dari jalur metabolisme primer dari organisme yang menghasilkannya. Metabolit sekunder dalam jangka panjang memiliki peranan sebagai tujuan pertahanan dan memberikan suatu karakteristik yang khas bagi tanaman dalam bentuk warna. Selain itu, metabolit sekunder juga digunakan sebagai penanda dan pengatur jalur metabolisme primer. Metabolit sekunder menghasilkan sejumlah besar senyawa-senyawa tertentu meskipun secara fungsinya tidak memiliki peranan dalam perkembangan yang diperlukan oleh tumbuhan untuk bertahan dan beradaptasi pada lingkungan pertumbuhannya (Julianto, 2019). Metabolit sekunder memiliki beberapa jenis golongan diantaranya senyawa terpenoid, fenil propanoid, poliketida, dan alkaloid. Selain itu golongan senyawa fenolik, flavonoid, saponin, minyak atsiri, tanin, dan steroid juga termasuk sebagai golongan metabolit sekunder.

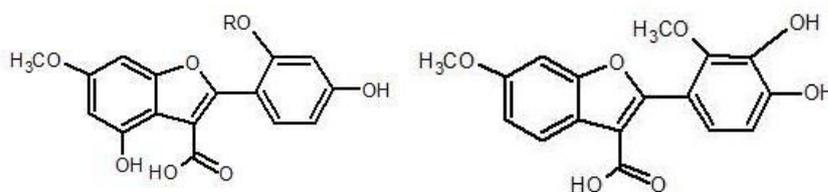
Senyawa fenolik merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksi yang menempel pada gugus aromatik. Dalam keadaan murni senyawa fenolik berupa zat padat tidak berwarna, kelarutan dalam air bertambah jika gugus hidroksil makin banyak. Salah satu tanaman yang menghasilkan senyawa fenolik adalah Turi Putih (*S. grandiflora* (L.) Pers) (Hasan *et al.*, 2012). Senyawa metabolit sekunder yang telah berhasil diisolasi dari Turi Putih (*S. grandiflora* (L.) Pers) yaitu senyawa *1,1'-binaphthalene-2,2'-diol*.

Senyawa ini memiliki pita serapan yang menunjukkan adanya kromofor fenolik. Berdasarkan serapan IR, senyawa ini menunjukkan adanya gugus hidroksil, CH alifatik dan C=C cincin aromatik. Pita serapan ini dinyatakan sebagai senyawa fenolik (Noviany *et al.*, 2012). Struktur senyawa hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Senyawa Bifenil dari Daun Turi.

Selain itu, Noviany *et al* (2018) berhasil mengisolasi senyawa *Sesbagrandidflorain* A dan B dari tumbuhan Turi Putih (*S. grandiflora* (L.) Pers). Data menunjukkan karakteristik puncak arilbenzofuran. Senyawa 2 menampilkan profil NMR satu dan dua dimensi yang sangat mirip dengan senyawa 1. Satu-satunya perbedaan adalah bahwa Senyawa 1 memiliki gugus -OCH yang melekat pada C-6 (A-ring) dan gugus -OH yang ditemukan pada Senyawa 2 di posisi yang sama. Senyawa baru hasil isolasi dan karakterisasi bioaktif lainnya dari ekstrak etil asetat kulit batang *S. grandiflora* memberikan senyawa 2-arilbenzofuran yang baru yaitu *Sesbagrandidflorain* C (Noviany *et al.*, 2020). Senyawa *Sesbagrandidflorain* A dan B telah mengalami perubahan pada strukturnya. Adapun struktur senyawa *Sesbagrandidflorain* dapat dilihat pada Gambar 5.



Sesbagrandidflorain A (**11**) R = CH₃

Sesbagrandidflorain B (**12**) R = H

Sesbagrandidflorain C (**13**)

Gambar 5. Struktur *Sesbagrandidflorain* A, B, dan C (Noviany *et al.*, 2021).

2.4 Inflamasi

Inflamasi merupakan salah satu respon tubuh terhadap suatu infeksi atau kerusakan jaringan tubuh yang ditandai dengan terjadinya kemerahan, pembengkakkan, rasa sakit, dan gangguan fungsi. Kriteria inflamasi adalah ada gejala lokal dan sistemik antara lain berupa migrasi leukosit ke jaringan yang mengalami peradangan. Respon imun yang terdapat pada tubuh akan melakukan tindakan agar dapat menghilangkan antigen, saat antigen dapat dilawan dan dihilangkan oleh imun tubuh maka hanya akan terjadi inflamasi akut. Artinya, inflamasi yang terjadi hanya berlangsung dalam waktu yang singkat bahkan hanya beberapa hari. Namun, jika penyebab terjadinya inflamasi ini tidak dapat dilawan oleh imun tubuh maka akan terjadi inflamasi kronik yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan hingga hilangnya fungsi fisiologis (Harlim, 2018).

Tujuan akhir dari respon inflamasi adalah menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera atau terinfeksi agar dapat mengisolasi, menghancurkan atau menonaktifkan agen yang masuk, membersihkan debris, dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan. Gejala proses inflamasi yang sudah dikenal yaitu :

1. Kemerahan.
Kemerahan muncul karena terjadi peningkatan aliran darah ke tempat cedera.
2. Rasa panas.
Rasa panas dan kemerahan cenderung muncul bersamaan, rasa panas umumnya hanya dirasakan jika peradangan terjadi di permukaan kulit.
3. Rasa sakit.
Rasa sakit akibat peradangan dapat disebabkan karena terjadinya peregangan jaringan akibat adanya edema serta adanya pengeluaran mediator nyeri yang dapat merangsang saraf disekitar radang.
4. Pembengkakkan.
Pembengkakkan terjadi disebabkan oleh peningkatan permeabilitas kapiler, peningkatan aliran darah, dan cairan ke jaringan yang mengalami cedera

sehingga protein plasma dapat keluar dari pembuluh darah ke ruang interstitium.

5. *Fungsiolaesa*.

Fungsiolaesa merupakan gangguan fungsi dari jaringan yang terkena inflamasi dan sekitarnya akibat proses inflamasi.

2.5 Antiinflamasi

Mekanisme antiinflamasi dimulai ketika prostaglandin dilepaskan ketika terjadi kerusakan sel dan obat antiinflamasi non steroid (OAINS) menghambat biosintesis prostaglandin. Enzim pertama dalam jalur pembentukan prostaglandin adalah siklooksigenase (COX). Dosis terapeutik dari OAINS menurunkan biosintesis prostaglandin dan menghambat COX, terdapat korelasi antara potensi sebagai penghambat COX dan aktivitas antiinflamasi. Umumnya pengobatan yang digunakan untuk mengatasi terjadinya inflamasi adalah obat modern dari golongan OAINS dan golongan steroid yang berguna untuk mengurangi pembengkakan dan rasa sakit peradangan. Pemakaian obat tersebut mempunyai efek samping seperti iritasi gastrointestinal, kerusakan ginjal, diare, sakit kepala, depresi, pankreatitis dan terapi ini terkadang agresif dan tidak efektif dalam beberapa kasus (Dewi dkk., 2015).

Natrium diklofenak merupakan salah satu golongan OAINS yang sering digunakan sebagai obat antiinflamasi. Obat ini memiliki daya antiinflamasi yang lebih kuat dengan efek samping yang ringan dibandingkan obat lainnya. Obat ini berkerja dengan menghambat enzim COX sehingga menghambat pembentukan prostaglandin. Terdapat dua isoform utama dari enzim COX, yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 dapat ditemukan dalam kebanyakan sel dan jaringan normal, sedangkan sitokin dan mediator inflamasi yang menyertai inflamasi menginduksi produksi COX-2 (Harlim, 2018).

2.6 Siklooksigenase-2 (COX-2)

Enzim siklooksigenase terdapat dalam dua bentuk yaitu siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2), COX-1 berperan dalam mengkatalis pembentukan prostaglandin yang bertanggung jawab terhadap fungsi-fungsi regulasi fisiologis. Sedangkan COX-2 berperan mengkatalis pembentukan prostaglandin yang menyebabkan reaksi inflamasi. Pada dasarnya, penyembuhan terhadap luka dibagi menjadi tiga tahap, yaitu fase inflamasi, fase fibroblastic, dan fase penyembuhan. Pada fase inflamasi, saat terjadi luka maka akan memicu pelepasan mediator inflamasi dan menyebabkan membran fosfolipid melepaskan asam arakidonat yang nantinya mensintesis prostaglandin E2 melalui jalur siklooksigenase yaitu peningkatan ekspresi COX-2. Fase penyembuhan akan mulai berlangsung dengan ditandai adanya penurunan tingkat produksi prostaglandin dan leukotrin yang diakibatkan dari penghambatan jalur siklooksigenase yaitu COX-2. COX-2 menjadi salah satu mediator yang dapat digunakan sebagai penanda adanya inflamasi (Prasetya, 2015).

Prostaglandin adalah agen pemberi sinyal yang kuat dalam tubuh manusia. Prostaglandin yang disintesis oleh isoform COX-2, secara substansial terlibat dalam menimbulkan dan mempertahankan proses inflamasi dengan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan memperkuat efek dari mediator inflamasi lain seperti kinin, serotonin dan histamin. Oleh karena itu mengurangi dan mengendalikan pembentukan prostaglandin ini dapat mengurangi pembengkakan, panas, dan nyeri peradangan.

2.7 Pengujian Aktivitas Antiinflamasi Secara *In Vitro* menggunakan Metode Denaturasi Protein

Denaturasi protein merupakan sebuah proses dimana protein kehilangan struktur tersier dan struktur sekundernya oleh senyawa eksternal, seperti asam kuat, basa kuat, garam organik terkonsentrasi, pelarut organik, dan pemanasan. Denaturasi protein dapat menjadi penyebab inflamasi (Aditya dkk., 2015). Pengujian

aktivitas antiinflamasi dapat dilakukan secara *in vitro* dengan metode penghambatan denaturasi protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Penghambatan denaturasi protein dapat terjadi karena adanya interaksi antara tirosin aromatik, treonin alifatik, dan residu lisin dari BSA terhadap sampel.

Pengujian secara *in vitro* dengan pengaruh pemanasan terhadap anti-denaturasi BSA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa antiinflamasi (Novika dkk., 2021). Penghambatan denaturasi protein dapat dilihat dengan pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Persentase penghambatan denaturasi BSA dapat dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

Senyawa yang menghambat denaturasi lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi dan dapat digunakan sebagai nilai acuan dalam pengembangan obat (William *et al.*, 2008). Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai persen inhibisi sehingga dapat ditentukan nilai IC_{50} dari nilai persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dan % inhibisi (Y).

2.8 Metode Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder

2.8.1 Isolasi

Isolasi merupakan suatu teknik pemisahan suatu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam. Tahapan ini merupakan tahapan awal yang dilakukan untuk memisahkan senyawa aktif atau komponen tertentu dengan komponen lainnya yang tidak diinginkan. Isolasi senyawa bahan alam terdiri dari beberapa tahap seperti ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian serta identifikasi senyawa murni (Pratiwi dkk., 2021).

2.8.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan senyawa kimia atau senyawa metabolit yang terdapat dalam sampel ke dalam pelarut. Prinsip dari metode ekstraksi didasarkan pada kemampuan distribusi zat terlarut ke dalam pelarutnya, hasil ekstraksi ini disebut ekstrak (Pratiwi dkk, 2021). Ekstraksi dengan pelarut dibedakan menjadi dua jenis ekstraksi yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Pada proses ekstraksi, bahan yang akan diekstrak akan berkontak langsung dengan pelarut dalam rentang waktu tertentu. Metode ekstraksi padat-cair salah satunya yaitu maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi padat-cair untuk mengekstrak senyawa metabolit dari jaringan tumbuhan yang belum diketahui komponen senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari. Prinsip dari metode maserasi didasarkan pada prinsip kelarutan *like dissolve like*. Proses maserasi dilakukan dalam rentang waktu tertentu dengan sesekali dilakukan pengadukan dan dilakukan pengulangan hingga semua sampel terekstrak dengan baik, setelah waktu tertentu ekstrak yang disebut maserat dipisahkan dengan filtrat dengan cara penyaringan. Maserasi biasanya dilakukan pengulangan dengan adanya penambahan pelarut setelah tahap penyaringan yang pertama dan disebut sebagai remaserasi. Dilakukan remaserasi bertujuan untuk memperoleh maserat yang lebih optimal dari pada hanya sekali maserasi (Atun, 2014).

Metode ekstraksi cair-cair seperti partisi adalah proses pemisahan zat terlarut di dalam dua macam pelarut atau lebih yang tidak dapat saling bercampur, umumnya metode ini dilakukan menggunakan labu pemisah dan membentuk dua fase/fraksi yang terpisah. Kedua fase tersebut dapat terbentuk karena adanya perbedaan polaritas antar pelarut. Hal tersebut memungkinkan dapat terjadi karena adanya sifat senyawa yang dapat larut air dan adapula senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik. Metode ekstraksi cair-cair dalam tahapan isolasi senyawa metabolit sekunder bertujuan untuk mengklasifikasikan dan memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran (Saputra dkk., 2018).

2.8.3 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen tertentu. Pada kromatografi, komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan yang mudah larut pada fase gerak akan bergerak lebih cepat (Atun, 2014). Beberapa teknik kromatografi yang digunakan adalah kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis (KLT), dan kromatografi kolom (KK).

2.8.3.1 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi Cair Vakum (KCV) merupakan modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi. Metode ini banyak digunakan untuk fraksinasi sampel dalam jumlah besar (10-50 gram). Metode ini sering digunakan untuk fraksinasi awal dari suatu ekstrak non polar atau ekstrak semi polar. Metode ini didasarkan pada kecenderungan senyawa terfraksinasi berdasarkan perbedaan kepolaran pada dua fase, fase diam (silika) dan fase gerak (eluen) dengan menggunakan bantuan alat vakum. Metode ini dipilih karena kecepatan proses (efisiensi waktu) dengan cara kolom dihisap menggunakan vakum. Penggunaan tekanan dimaksud agar laju aliran eluen meningkat dan meminimalkan proses difusi. Untuk proses pengelusian dilakukan dari pelarut yang non polar sampai dengan pelarut yang polar. Pada proses KCV diperlukan penggunaan kolom yang disambungkan dengan penampung eluen/fraksi yang dihubungkan dengan pompa vakum. Dalam mempersiapkan kolom dilakukan pengemasan fase diam secara kering dalam keadaan divakum agar diperoleh kerapatan maksimum. Kemudian dilakukan elusi pertama kali menggunakan pelarut non polar dan divakum hingga kering. Kolom siap dipakai apabila eluen turun dengan rata dan tidak ada rongga seperti keretakan pada fase diam. Sampel yang akan dipisahkan diabsorpsikan ke dalam silika kasar dan dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan lalu divakum hingga rapat. Sampel kemudian dielusi dengan pelarut, biasanya dimulai dengan

pelarut non polar hingga pelarut polar hingga kering dan diperoleh fraksi hasil KCV. Eluen merupakan campuran pelarut yang digunakan sebagai fase gerak yang berkerja dengan membawa komponen senyawa pada sampel dan bergerak perlahan melewati fase diam. Polaritas pelarut berpengaruh terhadap kemampuannya dalam membawa senyawa melewati fase diam.

2.8.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu metode kromatografi paling sederhana dan banyak digunakan. Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk analisis dan pemisahan sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT) untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua atau lebih pelarut murni) di dalam *chamber*. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (*visual*) atau di bawah sinar ultraungu (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok. Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Deteksi senyawa menjadi mudah ketika senyawa secara alami dapat berwarna atau berfluoresensi atau menyerap sinar UV (Wulandari, 2011). Metode KLT dapat dihitung dengan nilai *Retention factor* (R_f) dengan persamaan sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}}$$

2.8.3.3 Kromatografi Kolom (KK)

Kromatografi Kolom (KK) memiliki mekanisme pemisahan yang hampir sama dengan jenis kromatografi lain yaitu berkaitan dengan perbedaan antara gaya-gaya

antar molekul dalam sampel dengan fase gerak dan antara komponen dengan fase diam. Prinsip kerja dari KK yaitu zat cair yang bertindak sebagai fase gerak akan membawa cuplikan senyawa mengalir melalui fasa diam sehingga terjadi interaksi berupa absorpsi senyawa-senyawa tersebut oleh padatan dalam kolom. Kecepatan bergerak suatu komponen dalam cuplikan tergantung pada seberapa besar atau lama komponen tersebut tertahan oleh padatan dalam kolom. Hasil yang diperoleh berupa fraksi-fraksi senyawa yang mengalir keluar dari bagian bawah kolom untuk ditampung (Rubiyanto, 2017).

Fase diam seperti bahan penyerap atau film zat cair pada penyangga ditempatkan didalam tabung kaca berbentuk silinder dan pada bagian bawah tertutup dengan katup atau keran sedangkan fase gerak dibiarkan mengalir kebawah secara perlahan-lahan yang disebabkan oleh gaya gravitasi. Pita senyawa bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda dan dikumpulkan berupa fraksi yang keluar dari kolom. Pada kromatografi ini, campuran yang telah dipisahkan sebagai fraksi dapat dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis.

2.9 Karakterisasi Senyawa Secara Spektroskopi

Spektroskopi adalah metode yang digunakan untuk menganalisis sampel yang tidak diketahui dengan persentasi akurasi yang baik. Prinsip dasar pada teknik ini yaitu jumlah radiasi yaitu sinar atau cahaya (foton) yang diserap atau dipantulkan oleh sampel relatif terhadap intensitas cahaya datang pada panjang gelombang tertentu. Teknik ini digunakan untuk menganalisis kemurnian, komponen senyawa dalam campuran, jenis/interaksi kimia yang terjadi, dan penentuan kuantitatif (Harmita dkk., 2019).

2.9.1 *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS/MS)*

Liquid Chromatography (LC) digunakan untuk memisahkan campuran komponen yang berbentuk cair dan dapat dilakukan pemisahan dengan fase gerak cair dan

fase diam padat. *Mass Spectrometry* (MS) beroperasi dengan mengubah molekul analit menjadi keadaan bermuatan (terionisasi), diikuti dengan analisis ion dan ion fragmen apa pun yang dihasilkan selama proses ionisasi, berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Penggabungan spektrometri massa (MS) dengan teknik kromatografi selalu diinginkan karena sifat MS yang sensitif dan spesifik dibandingkan detektor kromatografi lainnya. Ada berbagai macam sumber pengion yang digunakan pada MS antara lain *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), *Atmospheric pressure photo-ionization* (APPI), dan *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI). Sumber ion yang digunakan pada penelitian yaitu jenis APCI yang merupakan teknik ionisasi yang menggunakan reaksi fase gas ion-molekul pada tekanan atmosfer, ion-ion dari sumber ion bereaksi dengan analit dan mengionisasi melalui transfer muatan.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan ion yang bermuatan akan dideteksi oleh spektrometer massa. Prinsipnya adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolaran, alatnya terdiri dari kolom sebagai fase diam dan pelarut tertentu sebagai fase geraknya. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolaran dan kecepatannya untuk sampai pada detektor sehingga waktu retensi yang diperoleh akan berbeda, perbedaan tersebut dapat diamati pada spektrum yang puncaknya terpisah. Data LCMS/MS yang diperoleh akan memberikan informasi mengenai berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Hasil dari analisis data pada metode ini akan didapatkan kromatogram berupa alur tinggi *peak* dan akan didapatkan bobot molekul sehingga dapat diketahui jumlah senyawa yang terdapat pada sampel. Keuntungan metode ini adalah dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi, massa molekul tinggi dan protein (Harmita dkk., 2019).

2.10 Studi *In Silico*

In silico adalah metode penelitian yang dilakukan dengan memanfaatkan media komputasi dan basis data untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut (Makatita dkk., 2020). Studi *in silico* merupakan pendekatan pada suatu kondisi atau keadaan nyata kedalam simulasi komputer dengan menggunakan program tertentu dalam mendesain obat. *In silico* memiliki cangkupan yang cukup luas diantaranya:

1. Studi *Docking*, merupakan pembelajaran komputasi mengenai pengikatan reseptor atau enzim protein yang berbeda.
2. Formasi Kimia, dimana aktivitas dan struktur berkorelasi dengan menggunakan sarana statistika.
3. Bioinformatika, dimana target obat dari data genom.

2.10.1 *Molecular Docking*

Molecular docking merupakan salah satu metode *in silico* yang sering digunakan untuk memprediksi interaksi dua molekul yang terjadi antara reseptor (biasanya protein) dengan suatu ligan dan menghasilkan model yang mengikat. *Docking* memungkinkan untuk memprediksi interaksi antara reseptor dengan ligan pada tingkat molekul dan menggambarkan bagaimana interaksi-interaksi yang terjadi diantara keduanya baik itu dari segi struktural maupun aktivitas yang terbentuk dari ikatan tersebut. Adanya perkembangan dan pemanfaatan teknologi yang baik memungkinkan dalam mengurangi biaya dan waktu serta meningkatkan peluang untuk menciptakan kandidat obat baru yang diinginkan secara efisien (Makatita dkk., 2020).

Molecular docking digunakan untuk memodelkan interaksi antara molekul kecil dan protein pada tingkat atom yang memungkinkan untuk mengkaraterisasi perilaku molekul tersebut di tempat pengikatan protein target. Proses docking melibatkan prediksi konformasi ligan, posisi, dan orientasinya di dalam situs atau pose dan penilaian afinitas pengikatan. *Molecular docking* dilakukan pada

wilayah yang spesifik pada protein target yang digunakan sebagai tempat pengikatan. Letak situs ini didasarkan pada posisi ligan atau *co*-faktor yang terkrystalisasi dengan struktur protein target atau posisi asam amino yang diketahui posisi pengikatannya. Analisis *molecular docking* dilakukan dengan melihat nilai energi bebas hasil ikatan. Kompleks ligan-reseptor yang dipilih adalah kompleks yang mempunyai nilai ikatan bebas terendah untuk dilakukan analisis lebih lanjut mengenai interaksi antara reseptor dan ligan yang dapat diamati pada Pymol (Rachmania *et al.*, 2018).

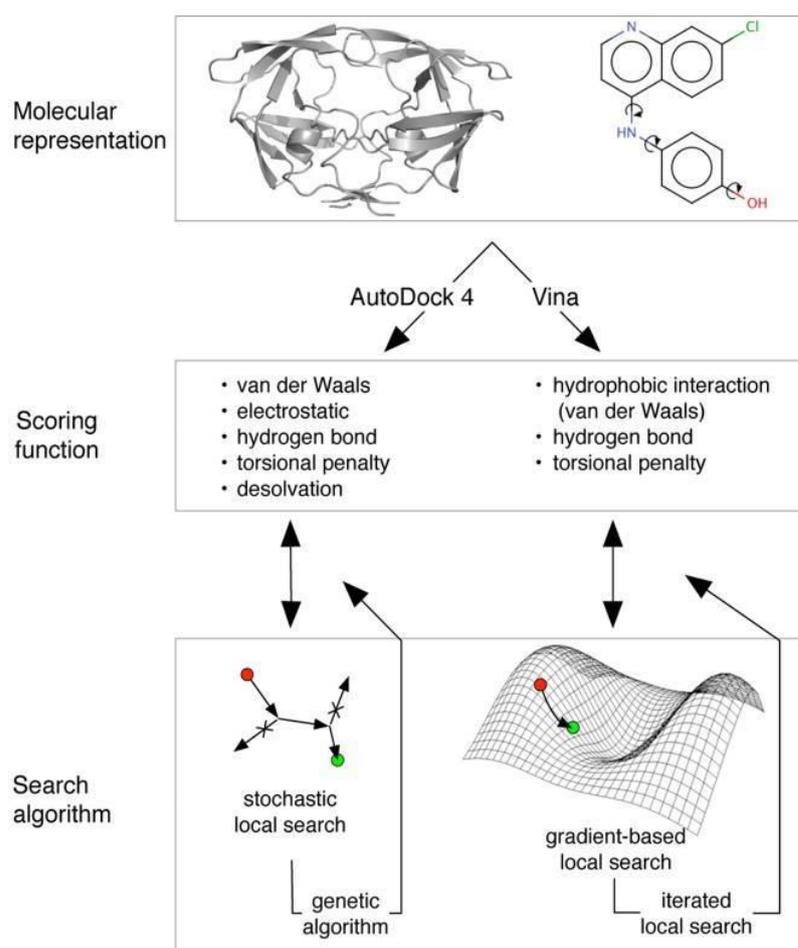
Molecular docking digunakan dalam mengamati dan menentukan konformasi reseptor dan ligan yang paling stabil dengan menganalisis kompleks *docking* yang memberikan afinitas pengikatan terendah, semakin rendah nilai energi ikatan maka semakin kuat dan stabil ikatan tersebut. Hasil analisis data yang diperoleh dari *docking* adalah nilai *affinity* terbentuk untuk menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dan protein. Validasi *molecular docking* dilakukan dengan melihat nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD), dimana nilai tersebut harus kurang dari 2 Å. Semakin kecil nilai RMSD maka prediksi posisi ligan semakin baik karena mendekati konformasi reseptor awal sebelum dilakukan *docking* (Yuliana *et al.*, 2023).

2.10.2 Perangkat Lunak

AutoDock merupakan perangkat lunak yang digunakan dalam pemodelan molekul. Prinsip dari *AutoDock* adalah mengevaluasi dari energi bebas, torsional bebas dari konformasi ikatan yang terbentuk antara enzim dan ligan berdasarkan energi medan gaya pada algoritma, serta kekuatan kompleks ligan-protein yang terbentuk secara kuantitatif dengan melihat nilai tetapan inhibisi. Nilai skor *docking* yang semakin negatif dan kecil menunjukkan konformasi yang terbentuk antara ligan dan enzim semakin stabil (Yuliana *et al.*, 2023).

AutoDock Vina merupakan salah satu aplikasi *docking* dari seri *AutoDock* bersama dengan seri lainnya yaitu *AutoDock 4* (AD4), *AutoDock GPU*, *AutoDock*

FR, dan *AutoDock CrankPep*. Diantara seri lainnya, *AutoDock Vina* yang paling banyak digunakan, hal ini karena *AutoDock Vina* mudah digunakan, beroperasi lebih cepat (lebih cepat dari *AutoDock 4*) dan memiliki akurasi yang lebih besar terhadap kompleks protein-ligan dibandingkan dengan seri lainnya. Pada program *AutoDock 4* dapat memberikan prediksi yang cukup berguna ketika memodelkan senyawa kecil dengan sedikit ikatan yang dapat berputar. Namun, jika model senyawa yang digunakan lebih besar, *AutoDock Vina* memberikan prediksi yang lebih baik dan 10 kali lebih cepat. Kedua program menggunakan jenis file input yang sama yang mendeskripsikan reseptor (umumnya kaku) dan ligan (fleksibel). Fungsi penilaian memiliki parameter yang serupa, tetapi telah dikalibrasi secara berbeda. Perbedaan kedua perangkat dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Perbedaan Fungsi *Scoring* dan Pencarian Algoritma Pada *AutoDock 4* dan *AutoDock Vina* (Chang *et al.*, 2010).

2.10.3 Sumber Informasi Data

2.10.3.1 *PubChem*

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) adalah salah satu situs yang berisi basis data kimia terbuka yang berada dibawah naungan *National Institutes of Health* (NIH). *PubChem* diluncurkan tahun 2004 dan telah menjadi sumber informasi kimia utama bagi para ilmuwan, mahasiswa dan masyarakat umum. Data pada *PubChem* tidak hanya berisi molekul kecil tetapi juga molekul yang lebih besar seperti nukleotida, karbohidrat, lipida, peptida dan makromolekul yang dimodifikasi secara kimia. *PubChem* merupakan gudang informasi kimia yang terdiri dari tiga data utama yaitu *Substance*, *Compound*, dan *BioAssay*. Data-data yang ada pada situs *PubChem* menyimpan beberapa kumpulan data dari molekul-molekul dalam bentuk tiga dimensi yang berasal dari berbagai sumber seperti instansi pemerintah, vendor bahan kimia, penerbit jurnal dan para peneliti di seluruh dunia (Hahnke *et al.*, 2018).

2.10.3.2 *Protein Data Bank (PDB)*

Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) adalah arsip data struktur makromolekul biologis di seluruh dunia. Semua data yang dikumpulkan merupakan data utama berisi koordinat, informasi umum yang dibutuhkan untuk semua struktur dan informasi khusus untuk metode penentuan strukturnya. PDB mendistribusikan data koordinat, file faktor struktur, file kendala NMR serta menyediakan dokumentasi dan data turunan. Data koordinat didistribusikan dalam format *.pdb dan *.mmCIF. Data yang tersedia pada PDB diperoleh dari berbagai peneliti di seluruh dunia yang telah melewati berbagai tahapan untuk menilai kualitas model atom yang diserahkan (validasi struktur) dan untuk menilai seberapa baik model molekul tersebut sesuai dengan data eksperimen (validasi eksperimental) (Berman, 2007).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Desember 2022 – November 2023 di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat. Analisis spektrofotometer ultraungu-tampak (UV-Vis) dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Analisis LCMS/MS dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Kepolisian Republik Indonesia, Sentul, Bogor, Jawa Barat.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat gelas dengan variasi ukuran, neraca analitik, satu set alat destilasi, penguap putar vakum (*rotary evaporator*), satu set alat kromatografi lapis tipis (KLT), satu set alat kromatografi cair vakum (KCV), satu set alat kromatografi kolom (KK), *water bath*, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu UV, spektrofotometer UV-Vis, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LCMS/MS), Perangkat keras berupa laptop, dan Perangkat Lunak *masslynk V4.1*, PyMOL, LigPlot, *AutoDock Vina*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah serbuk daun sungkai yang diperoleh dari Desa Belimbing, Kecamatan Peninjauan, Kabupaten Ogan

komering Ulu, Provinsi Sumatera Selatan pada Januari 2022 yang telah dikeringkan dan dihaluskan. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi berkualitas teknis yang telah didestilasi. Bahan yang digunakan adalah metanol, *n*-heksana, diklorometana, etil asetat, aseton, akuades, serum sulfat, silika gel merck G 60, silika gel 60 GF₂₄₅ (35-70 Mesh), plat KLT, *Bovine Serum Albumin*, natrium klorida, natrium diklofenak, dan *Tris base* (Merck).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Determinasi tumbuhan sungkai dilakukan di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat. Daun sungkai segar dicuci dan dibersihkan dari kotoran yang menempel, kemudian dikeringkan dengan cara dijemur tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Daun sungkai yang sudah kering kemudian dipisahkan dari tulang daun untuk dapat dilakukan proses penggilingan hingga menjadi serbuk halus.

3.3.2 Ekstraksi Sampel

Daun sungkai yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1,5 kilogram, kemudian dilakukan maserasi menggunakan pelarut metanol selama 1x24 jam sebanyak 3 kali pengulangan. Ekstrak hasil maserasi atau maserat dikumpulkan dengan cara disaring lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan putaran 120 *rpm*. Maserat kemudian ditimbang untuk diketahui beratnya. Kemudian maserat dipartisi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi metanol. Fraksi *n*-heksana dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sedangkan fraksi metanol dipartisi lebih lanjut menggunakan pelarut diklorometana dengan dilakukan penambahan akuades sehingga diperoleh fraksi diklorometana dan fraksi metanol-air. Fraksi

diklorometana dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sedangkan fraksi metanol-air dipartisi kembali dengan pelarut etil asetat dengan dilakukan penambahan akuades, sehingga didapatkan fraksi etil asetat dan fraksi metanol-air (*residu*). Masing-masing tahap partisi dilakukan dengan 3 kali pengulangan.

3.3.3 Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara *In Vitro* dengan Metode Denaturasi Protein

3.3.3.1 Pembuatan Larutan *Tris Buffer Saline* (TBS)

Sebanyak 4,35 gram NaCl dilarutkan dalam 200 mL aquades lalu ditambahkan 605 mg *Tris Base* lalu ditambahkan akuades hingga 400 mL. Kemudian diatur pH dengan menambahkan asam asetat glasial hingga pH berada pada kisaran 6,2-6,8. Lalu ditambahkan lagi akuades hingga 500 mL (Farida *et al.*, 2018).

3.3.3.2 Pembuatan 0,2% *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Sebanyak 0,2 gram *Bovine Serum Albumin* (BSA) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan dengan larutan *Tris Buffer Saline* (TBS) hingga volume 100 mL (William *et al.*, 2008).

3.3.3.3 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 50 μ L metanol ditambahkan dengan larutan 0,2% BSA dalam labu ukur hingga 5 mL.

3.3.3.4 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Sebanyak 200 mg natrium diklofenak dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL hingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 20.000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 10.000, 8000, 6000, 4000, dan 2000 ppm. Perhitungan pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.3.3.5 Pembuatan Larutan Uji

Sebanyak 200 mg fraksi dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 20.000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 10.000, 8.000, 6.000, 4.000 dan 2.000 ppm. Perhitungan pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.3.3.6 Pengukuran Aktivitas Antiinflamasi menggunakan Spektrofotometer UV-VIS

Diambil sebanyak 50 μ L dari setiap konsentrasi larutan (larutan uji dan kontrol positif), kemudian ditambahkan larutan 0,2% BSA hingga volume mencapai 5 mL. Campuran tersebut dibuat dalam konsentrasi 100, 80, 60, 40 dan 20 ppm untuk setiap larutan uji dan kontrol positif. Setiap larutan diinkubasi pada suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit kemudian dipanaskan pada suhu $\pm 72^{\circ}\text{C}$ dengan *water bath* selama 5 menit dan didinginkan pada suhu ruang selama 25 menit. Setelah dingin, larutan divortex dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm (Farida *et al.*, 2018). Uji aktivitas antiinflamasi dilakukan sebanyak dua kali (*duplo*).

3.3.4 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Fraksi yang memiliki potensi antiinflamasi kemudian difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Prinsip KCV yaitu partisi dan adsorpsi yang pemisahannya menggunakan bantuan tekanan dari pompa vakum. Fase diam pada fraksinasi KCV menggunakan silika gel halus yang dimasukkan kedalam kolom sebanyak 10 kali dari massa sampel. Kolom yang telah berisi silika kemudian dikemas kering dalam keadaan vakum menggunakan alat vakum. Fase gerak (eluen) menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran meningkat (*gradien*). Eluen dimasukkan dengan hati-hati ke dalam kolom kemudian dihisap hingga kering dengan alat vakum.

Fraksi yang akan digunakan untuk KCV dilarutkan menggunakan aseton dan diimpregnasi menggunakan silika kasar hingga homogen. Hasil impregnasi kemudian dimasukkan kedalam kolom yang telah berisi fasa diam dan ditambahkan kertas saring diatasnya. Setelah itu kolom siap digunakan, maka dilakukan proses pengelusan menggunakan eluen *n*-heksana-EtoAc 100% hingga *n*-heksana 0% lalu divakum secara perlahan hingga kering. Hasil elusi dari tiap eluen ditampung dan dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis.

3.3.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk melihat pola pemisahan komponen senyawa. Metode KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa silika gel 60 F₂₄₅ sedangkan fase gerak (eluen) yang digunakan diantaranya pelarut *n*-heksana, diklorometana, kloroform, etil asetat, aseton, isopropil alkohol dan metanol. Fraksi yang diperoleh ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan kombinasi pelarut yang sesuai, bercak yang muncul pada plat KLT dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Wulandari, 2011). Noda pada plat KLT dapat ditampakkan dengan cara disemprot menggunakan reagen yang sesuai dan biasanya menggunakan serum sulfat. Noda dari fraksi yang memiliki pola pemisahan dengan nilai *retention factor* (Rf) yang sama digabungkan dan dipekatkan untuk dilakukan fraksinasi lebih lanjut.

3.3.6 Kromatografi Kolom (KK)

Hasil fraksi yang memiliki pola pemisahan yang terbaik selanjutnya dilakukan pemurnian menggunakan metode kromatografi kolom. Adsorben *silica gel Merck* (35-70 Mesh) dilarutkan dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses pengelusan. Bubur (*slurry*) dari silika gel yang sudah tercampur sempurna dengan pelarut dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kolom, fasa diam diatur hingga rapat dan tidak berongga. Sampel yang telah diimpregnasi dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi fasa diam secara perlahan-lahan. Selama proses

elusi berlangsung, kondisi kolom tidak boleh kering atau kehabisan pelarut agar tidak terjadi perubahan pada fase diam dan tetap dalam kondisi rapat yang tidak berongga. Fraksi hasil kolom ditampung kedalam botol vial dan dilakukan monitoring KLT untuk penggabungan fraksi yang memiliki nilai Rf yang sama.

3.3.7 Identifikasi Senyawa menggunakan *liquid Chromatography-Mass Spectoscopy* (LCMS/MS)

Fraksi yang akan diuji ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dalam metanol, larutan fraksi tersebut diambil sebanyak 10 μ L lalu diinjeksikan kedalam LCMS/MS melalui kolom ACQUITY UPLC® BEH C18 dengan menentukan waktu retensi yang sesuai untuk dianalisis spektrum fraksi (Rudiana *et al.*, 2019).

3.3.8 Uji Potensi Antiinflamasi Secara *In Silico* Menggunakan Metode *Molecular Docking*

Senyawa yang telah dikarakterisasi kemudian dilakukan uji antiinflamasi secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Perangkat keras yang digunakan berupa Laptop Acer dengan Prosesor Intel(R) Core(TM) i3-2328M CPU @ 2.20GHz 2.20 GHz, *Random Access Memory* (RAM) 4 *gigabyte*, dengan Sistem Operasional Windows 10 Pro. perangkat lunak yang digunakan berupa paket *AutoDock Tools* 1.5.7, *Notepad*, *AutoDock Vina*, *PyMol*, dan *LigPlot*.

3.3.8.1 *Re-Docking*

Protein yang akan digunakan ditelusuri pada situs *Protein Data Bank* (<http://www.rscb.org/pdb>) lalu diunduh dalam bentuk struktur tiga dimensi dengan format *.pdb. Preparasi protein dilakukan dengan menghilangkan molekul air, ligan asli, dan residu non-standar yang masih menempel pada reseptor. Kemudian, ligan dan reseptor yang terpisah disimpan dalam format *.pdb. Lalu, ditambahkan muatan kedalam reseptor dan disimpan dalam format *.pdbqt. Pada saat dilakukan pemisahan ligan asli dari reseptor dilakukan juga penentuan koordinat tempat interaksi reseptor dengan ligan bawaan (*GridBox*), dimana koordinat ini akan digunakan untuk meletakkan ligan dari senyawa hasil

isolasi. Pada koordinat inilah akan dianalisis interaksi ligan dengan reseptor, kemudian disimpan dengan format *.grid.gpf . selanjutnya dilakukan *docking* antara ligan dan reseptor hingga diperoleh struktur kompleks ligan-reseptor. Analisis dilakukan dengan pengulangan hingga didapatkan nilai energi ikatan dan nilai RMSD.

3.3.8.2 *Docking*

Senyawa hasil isolasi yang akan digunakan sebagai ligan diunduh pada situs *PubChem* dalam bentuk tiga dimensi dengan format *.sdf. Senyawa tersebut yang nantinya akan berikatan dengan reseptor yang telah mengalami *re-docking*. Ligan disiapkan dengan mengubah format awal *.sdf menjadi format *.pdbqt agar dapat dilakukan tahap *docking* pada reseptor yang juga telah disiapkan dalam format *.pdbqt. Proses pengikatan ini akan terjadi pada posisi atau koordinat yang sama dengan ligan natif reseptor sehingga diperoleh nilai energi ikatan yang digunakan sebagai acuan dalam validasi *docking* (Yuliana *et al.*, 2023).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi daun sungkai (*peronema canescens* jack) serta studi potensi antiinflamasi secara *in silico* diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Fraksi Etil asetat memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dengan nilai IC_{50} sebesar 52,12 $\mu\text{g/mL}$.
2. Hasil karakterisasi senyawa menggunakan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LCMS/MS) dan diinterpretasikan dengan *software Masslynx*, senyawa NV37 diduga senyawa flavonoid dengan formula molekul $C_{16}H_{12}O_5$.
3. Hasil analisis rumus molekul, senyawa metabolit dari NV37 diidentifikasi sebagai senyawa acacetin.
4. Berdasarkan hasil *docking* diperoleh nilai RMSD $<2\text{\AA}$ sehingga hasil *docking* dinyatakan valid.
5. Berdasarkan hasil penambatan ligan NV37 terhadap reseptor 3LN1 diperoleh nilai afinitas ikatan lebih besar dari ligan natifnya yaitu sebesar -8,78 kkal/mol, sedangkan penambatan ligan CEL pada 3LN1 diperoleh nilai sebesar -12,4 kkal/mol.
6. Berdasarkan penambatan ligan NV37 terhadap reseptor 5KIR juga diperoleh nilai afinitas ikatan yang lebih besar dari ligan natifnya yaitu sebesar -6,16 kkal/mol, sedangkan penambatan ligan RCX pada reseptor 5KIR diperoleh nilai afinitas ikatan sebesar -9,93 kkal/mol.

7. Nilai afinitas ikatan yang diperoleh dari hasil penambatan ligan NV37 terhadap reseptor 3LN1 dan 5KIR diperoleh nilai yang lebih besar dari ligan natifnya namun masih bernilai negatif, artinya senyawa NV37 telah berhasil membentuk ikatan dan berpotensi sebagai inhibitor inflamasi.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, ada beberapa saran yang dapat diberikan untuk penelitian lainnya, yaitu sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap fraksi aktif lainnya.
2. Perlu dilakukan uji antiinflamasi lebih lanjut terhadap senyawa murni hasil isolasi.
3. Perlu dilakukan pengerjaan *docking* lebih mendalam dengan *software* lainnya sebagai pembanding untuk lebih mendukung validasi *docking* antara ligan dengan makromolekul.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditya, M. R. T., Marisa, D., dan Suhartono, E. 2015. Potensi Antiinflamasi Jus Buah Manggis (*Garcinia mangostana*) Terhadap Denaturasi Protein *In Vitro*. *Berkala Kedokteran*. 11(2): 149-156.
- Agustina, S., Ruslan, dan Wiraningtyas, A. 2016. Skrining Fitokimia Tanaman Obat di Kabupaten Bima. *Cakra Kimia*. 4(1): 2302-7274.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Borobudur*. 8(2): 53-61.
- Berman, H. M. 2007. The Protein Data Bank: a Historical Perspective. *Acta Cryst.* 64: 88-95.
- Chang, M. W., Ayeni, C., Breuer, S., and Torbett, B. E. 2010. Virtual Screening for HIV Protease Inhibitor: a Comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS ONE*. 5(8): 11955.
- Chaurasiya, N. D., Gogineni, V., Elokely, K. M., Leon, F., Nunez, M. J., Klein, M. L., Walker, L. A., Cutler, S. J., and Tekwani, B. L. 2016. Isolation of Acacetin from *Calea urticifolia* with Inhibitory Properties against Human Monoamine Oxidase -A and -B. *J Nat Prod*. 79(10). 2538-2544.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. 2018. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated diseases in Organ. *Oncotarget*. 9(6): 7204-7218.
- Dewi, T. S., Puspawati, N. M., dan Suarya, P. 2015. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Eter Kulit Batang Tenggulun (*Protium Javanicum* Burm) Terhadap Edema Pada Tikus Wistar yang diinduksi dengan Karagenan. *Jurnal Kimia*. 9(1): 13-19.

- Fadlilaturrahmah, Amalia, J., Sukmawaty, Y., dan Wathan, N. 2022. Identifikasi Fitokimia dan Uji Aktivitas Antiinflamasi *In Vitro* Fraksi *n*-Heksana Kapur Naga (*Calophyllum soulattri* Burm F) dengan Metode Uji Penghambatan Denaturasi Protein Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Pharmascience*. 9(2): 355-367.
- Farida, Y., Rahmat, D., and Amanda, A. W. 2018. Antiinflammation Activity Test of Nanoparticles Ethanol Extract of Temulawak Rhizome (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) with Protein Denaturation Inhibition Method. *JIFI*. 16(2): 225-230.
- Fitriana, R., Soesetijo, A., dan sulistyaningsih, E. 2019. Identifikasi Kontaminasi Aflatoksin pada Rempah-Rempah yang dijual di Sentra Pasar di Kabupaten Jember. *Multidisciplinary Journal*. 2(1): 24-28.
- Fransisca, D., Kahanjak, D. N., dan Frethernety, A. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Cakram Kirby-Bauer. *JPLB*. 4(1): 460-470.
- Gauthier, T., Wang, X., Santos, J. S. D., Fysikopoulos, A., Tadrist, S., Canlet, C., Artigot, M. P., Loiseau, N., Oswald, I. P., and Puel, O. 2012. Trypacidin, a Spore-Borne Toxin from *Aspergillus fumigatus*, Is Cytotoxic to Lung Cells. *PLoS ONE*. 7(2).
- Hahnke, V. D., Kim, S., and Bolton, E. E. 2018. PubChem Chemical Structure Standardization. *J Cheminform*. 10(36): 13321.
- Hambal, M., Darmawi, Nurmayasari, Balqis, U., Ferasyi, T. R. dan Aisyah, S. 2016. Konsentrasi Protein Antigen Ekskretori/Sekretori dan Somatik pada *Fasciola gigantica* dan *Euytrema pancreaticum*. *Jurnal Medika Veterinaria*. 10(2): 2503-1600.
- Harlim, A. 2018. *Buku Ajar Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Immunologi Inflamasi*. Universitas Kristen Indonesia. Jakarta.
- Harmita, K., Harahap, Y., dan Supandi. 2019. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LCMS/MS)*. ISFI Penerbitan. Jakarta Barat.

- Hasan, N., Osman, H., Mohamad, S., Chong, W. K., Awang, K., and Zahariluddin, A. S. M. 2012. The Chemical Components of *Sesbania grandiflora* Root and Their Antituberculosis Activity. *Pharmaceuticals*. 5: 882-889.
- Hidayanti, I. 2020. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Ifory., Fauziah, F., dan Mayora, S. A., 2020. Aktivitas Antiinflamasi dan Daya Hambat Siklooksigenase-2 Ekstrak Etanol Daun Tembelekan (*Lantana camara* L.). *Jurnal Farmasi Higea*. 12(1): 32-39.
- Julianto, S. T. 2019. *Fitokimia: Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta.
- Khasanah, U. 2021. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta Studi Potensi Antivirus *Coronavirus disease* (COVID-19) Secara *In Silico*. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Kitagawa, I., Simanjuntak, P., Hori, K., Nagami, N., Mahmud, T., Shibuya, J., and Kobayashi, M. 1994. Indonesian Medical Plant. VII. Seven New Clerodane-Type Diterpenoids, Peronemins A2, A3, B1, B2, B3, C1, and D1 from The Leaves of *Peronema Canescens* (Verbenaceae). *Chem Pharm Bull*. 42(5): 1050-1055.
- Latief, M., Tarigan, I. L., Sari, P. M., dan Aurora, F. E. 2021. Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Pada Mencit Putih Jantan. *Pharmacon*. 18(1): 23-27.
- Makatita, F. A., Wardhani, R., dan Nuraini. 2020. Riset *In Silico* Dalam Pengembangan Sains di Bidang Pendidikan, Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana Sebagai Agen Anti-aging. *Jurnal ABDI*. 2(1): 2716-0122.
- Martawijaya, A., Kartasujana, I., Mandang, Y.I., Praiwira, S.A., dan Kadir, K. 2005. *Atlas Kayu Indonesia Jilid 1*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Departemen Kehutanan.

- Minarti, Ruga, R., dan Marlina, E. 2021. Aktivitas antiinflamasi ekstrak methanol daun pare hutan (*Momordica balsamina* Linn) dalam Menghambat Denaturasi Protein. *Prosiding Seminar Nasional Kimia* :103-107. Samarinda, 03 Oktober 2021: Universitas Mulawarman.
- Muharni, Yohandini, H., Ferlinahayati dan Julinar. 2022. Edukasi Penggunaan Tumbuhan Sungkai (*Peronema Canescens*) Untuk Menurunkan Kolesterol. *PEPADU*. 3(1): 2715-9574.
- Ningsih, A., Subeha, dan Natsir, M. D. 2013. Potensi Antimikroba dan Analisis Spektroskopi Isolat Aktif Ekstrak *n*-Heksana Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Terhadap Beberapa Mikroba Uji. *Skripsi*. Universitas Hasanudin.
- Noviany, N., Nurhidayat, A., Hadi, S., Suhartati, T., Aziz, M., Purwitasari, N., and Subasman, I. 2018. *Sesbgrandiflorain* A and B: Isolation of Two New 2-arylbenzofurans from The Stem Bark of *Sesbania grandiflora*. *Natural Product Research*. 32(21): 2558-2564.
- Noviany, Osman, H., Chong, K. W., Awang, K., and Manshoor, N. 2012. Isolation and Characterisation of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol, New Biaryl Natural Product from *Sesbania grandiflora* Root. *Journal of Basic & Applied Sciences*. 8: 253-256.
- Noviany, N., Samandi, A., Carpenter, E. L., Abugrain, M. E., Hadi, S., Purwitasari, N., Indra, A., and Mahmud, T. 2021. Structural Revision of *Sesbgrandiflorain* A and B and Synthesis and Biological Evaluation of 6-metoksi-2-arylbenzofuran derivatives. *J Nat Med*. 75: 66-75.
- Noviany, N., Samandi, A., Yulian, N., Hadi, S., Aziz, M., Purwitasari, N., Mohamad, S., Ismail, N. N., Gable, K. P., and Mahmud, T. 2020. Structure Characterization and Biological Activity of 2-arylbenzofurans from an Indonesian Plant *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Phytochemistry Letters*. 35: 211-215.
- Novika, D. S., Ahsanunnisa, R., dan Yani, D. F. 2021. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Penghambatan Denaturasi Protein. *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. 3(1): 16-22.

- Plantamor. 2020. Plantamor Situs Dunia Tumbuhan.
<http://plantamor.com/species/info/peronema/canescens>. Diakses pada 15 november 2021.
- Prabawani, A. G. 2023. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Polar Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta Studi Potensi Antivirus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-COV-2) Secara *In Silico*. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Prasetya, R. C. 2015. Ekspresi dan Peran Siklooksigenase-2 dalam Berbagai Penyakit di Rongga Mulut. *Stomatognatic*. 12(1): 16-19.
- Pratiwi, D., Nisa, D. Q., Martia, E., Wulanbirru, P., dan Andini, S. D. 2021. Isolasi Senyawa Kumarin Pada Tanaman. *Syntax Idea*. 3(7): 1576-1585.
- Pratoko, D. K. 2012. Molecular Docking Senyawa Fitokimia *Piper Longum* (L.) Terhadap Reseptor Siklooksigenase-2 (Cox-2) Sebagai Antiinflamasi. *Chem Prog*. 5(1): 31-36.
- Rachmania, R. A., Hariyanti, and Rochmah, N. 2018. Molecular Docking Study of Lemon (*Citrus limon* (Linn) Burm. F) Flavonoid Derivatives Compound in Reseptor Cyclooxygenase-1 (COX-1) as Antiplatelet in Ischaemic Stroke disease. *MICH-PhD*. 19-25.
- Rahmi, Herawati, N., dan Dini, I. 2016. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn). *Jurnal Chemica*. 17(1): 98-107.
- Rubiyanto, D. 2017. *Teknik Dasar Kromatografi*. Deepublish. Yogyakarta.
- Rudiana, T., Suryani, N., Indriatmoko, D. D., Yusransyah, Amelia, A., Noviany, and Hadi, S. 2019. Characterization of Antioxidative Fraction of Plant Stem *Bouea macrophylla* Griff. *J Phys: Conf Ser*. 1341(7): 1742-6596.
- Santoso, B. 2011. *Docking* Analog Kurkumin Turunan *Piperazindion* dengan Tubulin (1TUB) Rantai B Menggunakan Vina dan *AutoDock*. *PHARMACOM*. 12(1): 14-18.

- Saputra, T. R., Ngatin, A., dan Tonapa, S. Y. 2018. Penggunaan Metode Ekstraksi Maserasi dan Partisi Pada Tumbuhan Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata*) dengan Kepolaran Berbeda. *Jurnal of Chemistry*. 3(1): 5-8.
- Suwandi, J. F., Wijayanti, M. A., and Mustofa, M. 2018. *In Vitro* Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of a Sungkai (*Peronema canescens*) Leaf Extract. *Int J Pharm Pharm Sci*. 10(10): 109-113.
- William, L. A. D., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J. A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H., and Kraus, W. 2008. The *In Vitro* Anti-denaturation Effect Induced by Natural Product and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for The Detection of Anti-inflamantory Compounds without the use of Animal in The Early Stages of The Drug Discovery Process. *West Indian Med J*. 57(4): 327.
- Winardi, D. O., Alliyah, S. A., Fadilah, S. N., Sirait, J., Putra, H. B. A., Neli, N., Puspitadewi, N., Muchtaridi, M., and Zuhrotun, A. 2023. In Silico and In Vitro Studies on Compounds in Turmeric (*Curcuma domestica*) as Antiinflammatory for Cyclooxygenase-2 (COX-2). *IJPST-SUPP*. 1(1): 110-111.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Taman Kampus Presindo. Jember.
- Yani, A. P. and Putranto, A. M. H. 2014. Examination of The Sungkai's Young Leaf Extract (*Peronema canescens*) as an Antipyretic, Immunity, Antiplasmodium and Teretogenity in Mice (*Mus mucus*). *IJSE*. 7(1): 30-34.
- Yassir, M. dan Asnah. 2018. Pemanfaatan Jenis Tumbuhan Obat Tradisional di Desa Batu Hamparan Kabupaten Aceh Tenggara. *Jurnal Biotik*. 6(1): 17-34.
- Yuliana, A., Rahmiyani, I., and Kartika, C. 2023. Molecular Docking and Molecular Dinamics Simulation using *Monascus sp.* As a Candidate Cervical Cancer Drug. *J Trop Pharm Chem*. 7(1): 2407-6090.