



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENAPISAN *IN SILICO* BASIS DATA SENYAWA TANAMAN  
OBAT DI INDONESIA DAN UJI *IN VITRO* AKTIVITAS  
PENGHAMBATAN ELASTASE DAUN *Melaleuca leucadendron* L.**

**TESIS**

**MUNAWAROHTHUS SHOLIKHA  
1106107126**

**FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM MAGISTER HERBAL  
DEPOK  
JANUARI 2013**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENAPISAN *IN SILICO* BASIS DATA SENYAWA TANAMAN  
OBAT DI INDONESIA DAN UJI *IN VITRO* AKTIVITAS  
PENGHAMBATAN ELASTASE DAUN *Melaleuca leucadendron* L.**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains**

**MUNAWAROHTHUS SHOLIKHA  
1106107126**

**FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM MAGISTER HERBAL  
HERBAL ESTETIK  
DEPOK  
JANUARI 2013**

## SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarism, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 17 Januari 2013



(Munawarohthus sholikha)

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah  
saya nyatakan dengan benar.

Nama : Munawarohthus Sholikha

NPM : 1106107126

Tanda Tangan :



Tanggal : 17 Januari 2013

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Munawarohthus Sholikha

NPM : 1106107126

Program Studi: Magister Herbal

Judul Tesis : Penapisan *In Silico* Basis Data Senyawa Tanaman Obat di Indonesia dan Uji *In Vitro* Aktivitas Penghambatan Elastase Daun *Melaleuca leucadendron* L.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt. (.....)

Pembimbing II : Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. (.....)

Ketua : Dr. Hayun, M.Si., Apt. (.....)

Sekretaris : Dr. Rani Sauriasari, Msc., Apt. (.....)

Penguji I : Dr. Abdul Mun'im, M.S., Apt. (.....)

Penguji II : Dr. Herman Suryadi, M.Si., Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 17 Januari 2013

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains, Program Studi Magister Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si, Apt., selaku dosen pembimbing tesis yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis ini;
2. Ibu Dr. Berna Elya, M.Si, Apt., selaku dosen pembimbing tesis yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis ini;
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi;
4. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.S., Apt., selaku Ketua Program Studi Magister Herbal yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi;
5. Bapak Anton Bahtiar, Apt., PhD., dan Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si, Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi;
6. Seluruh staf pengajar Program Magister Herbal Fakultas Farmasi yang telah dengan tulus membekali ilmu kepada penulis;
7. Orang tua dan adik yang senantiasa memberikan dukungan dan doa demi kelancaran studi penulis;
8. Pihak Kebun Kampoeng Djamoeh Organik Martha Thilaar dan LIPI yang telah membantu dalam pengadaan bahan baku tanaman serta determinasi tanaman;
9. Rekan-rekan angkatan 03 dan 04 Magister Herbal;

10. Rekan-rekan di ruang penelitian laboratorium Komputasi Biomedik dan Rancangan Obat: Olin, Rezi, Mba Eva, Elma, Bram, Syahrir, Wahyu, Aulia, Ajid;
11. Sahabat seperjuangan di laboratorium penelitian fitokimia, laboratorium kimia kuantitatif, yang senantiasa memberikan semangat, dukungan, dan doa.
12. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan tesis ini.

Penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangannya, baik dari segi ilmiah maupun penyajiannya. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi rekan-rekan Farmasi khususnya dan para pengembang ilmu pengetahuan, sehingga manfaatnya dapat dirasakan oleh masyarakat.

**Penulis**

**2013**

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Munawarohthus Sholikha  
NPM : 1106107126  
Program Studi : Magister Herbal  
Fakultas : Farmasi  
Jenis karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**PENAPISAN *IN SILICO* BASIS DATA SENYAWA TANAMAN OBAT DI INDONESIA DAN UJI *IN VITRO* AKTIVITAS PENGHAMBATAN ELASTASE DAUN *Melaleuca leucadendron* L.**

berserta perangkat yang ada (bila diperlukan) Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk basis data, merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok  
Pada Tanggal: 17 Januari 2013  
Yang menyatakan



(Munawarohthus Sholikha)

## ABSTRAK

Nama : Munawarohthus Sholikha  
Program Studi : Magister Herbal  
Judul : Penapisan *In Silico* Basis Data Senyawa Tanaman Obat di Indonesia dan Uji *In Vitro* Aktivitas Penghambatan Elastase Daun *Melaleuca leucadendron* L.

Penghambatan aktivitas elastase dapat diterapkan sebagai metode untuk melindungi terhadap penuaan kulit. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh tanaman Indonesia yang memiliki potensi sebagai inhibitor elastase menggunakan penapisan virtual dengan piranti lunak penambatan molekul AutoDock. Penapisan virtual dari 1406 senyawa dari basis data senyawa tanaman obat di Indonesia terhadap penghambatan elastase diperoleh peringkat tertinggi yakni senyawa leucadenon A-D. Pengujian secara *in vitro* terhadap penghambatan elastase dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi daun *Melaleuca leucadendron* L. yang mengandung senyawa leucadenon A-D yang menempati peringkat 5 besar teratas dari hasil penapisan virtual. Daun segar *M. leucadendron* L. diekstraksi secara maserasi dengan pelarut aseton kemudian difraksinasi dengan kloroform. Fraksi kloroform difraksinasi kembali menggunakan kromatografi cair vakum sehingga didapatkan 6 fraksi (A-F) yang digabungkan berdasarkan profil KLT. Persen inhibisi elastase berturut-turut pada konsentrasi 50; 25; dan 12,5 µg/mL, fraksi A adalah 68,3; 57,0; dan 47,6% dan fraksi B adalah 68,1; 64,0; dan 48,3%. Pada konsentrasi yang sama, nilai persen inhibisi fraksi A dan B lebih besar jika dibandingkan asam oleanolat yaitu 62,4; 55,9; dan 46,5%. Uji kinetika enzim menunjukkan fraksi B daun *M. leucadendron* L. menghambat elastase secara kompetitif. Hasil identifikasi golongan senyawa menunjukkan bahwa fraksi A dan B daun *M. leucadendron* L. mengandung flavonoid dan terpen.

Kata Kunci : elastase, penapisan virtual, *Melaleuca leucadendron* L.  
xvii+89 halaman : 19 gambar; 14 tabel; 30 lampiran  
Daftar Pustaka : 67 (1966-2012)

## ABSTRACT

Name : Munawarohthus Sholikha  
Major : Magister Herbal  
Title : *In Silico* Screening Database of Medicinal Plants Compounds in Indonesia and *In Vitro* Assay Elastase Inhibitory of *Melaleuca leucadendron* L. Leaves

Inhibition of elastase activity can be applied as a method to protect against skin aging. This research was conducted to obtain Indonesian plants that have potential as elastase inhibitors using virtual screening with the molecular docking software AutoDock. Virtual screening of 1406 compounds from a database of medicinal plants in Indonesia on the inhibition of elastase obtained the highest rank is leucadenone A-D. *In vitro* assay on elastase inhibitory of leaves extract and fractions *Melaleuca leucadendron* L. containing leucadenone A-D compounds which ranks the top 5 of the virtual screening results. Fresh leaves of *M. leucadendron* L. extracted by maceration with acetone and then fractionated with chloroform. Chloroform fraction was fractionated using vacuum liquid chromatography and obtained 6 fractions (A-F) were combined based on TLC profiles. Percent inhibition of elastase at concentrations of 50; 25; and 12.5 µg/mL respectively, fraction A was 68.3; 57.0; and 47.6% and fraction B was 68.1; 64.0; and 48.3%. At the same concentration, percent inhibition of fractions A and B greater than oleanolol acid was 62.4; 55.9; and 46.5%. Enzyme kinetics assays showed that B fraction leaves *Melaleuca leucadendron* L. inhibited competitively. Phytochemical screening showed that A and B fraction leaves of *M. leucadendron* L. contained flavonoids and terpenes.

Key Words : elastase, virtual screening, *Melaleuca leucadendron* L.  
xvii + 89 pages: 19 pictures; 14 tables; 30 appendices  
Bibliography : 67 (1986-2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG .....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	viii
ABSTRAK .....	ix
ABSTRACT .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Hasil Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Proses Penuaan Kulit.....	4
2.2 Elastase .....	6
2.3 Elastin.....	9
2.4 Herbal dan Senyawa Anti Elastase .....	10
2.5 <i>Melaleuca leucadendron</i> (Kayu Putih) .....	11
2.4.1 Klasifikasi <i>Melaleuca leucadendron</i> L.....	11
2.4.2 Morfologi .....	12
2.4.3 Ekologi, Penyebaran dan Budidaya.....	12
2.4.4 Kandungan Kimia.....	13
2.4.5 Manfaat .....	13
2.6 Bioinformatika .....	14
2.7 Penambatan Molekuler .....	14
2.8 Autodock .....	15
2.9 Penapisan Virtual .....	16
2.9.1 Struktur Protein untuk Penapisan Virtual .....	17
2.9.2 Penapisan Virtual Menggunakan Autodock.....	17
2.10 Basis Data .....	18
2.11 Protein Data Bank .....	19
2.12 VegaZZ.....	19
2.13 Open Babel .....	20
2.14 PyRx .....	20

2.15	PyMOL .....	21
2.16	Ekstraksi .....	21
	2.16.1 Ekstraksi Secara Dingin .....	22
	2.16.2 Ekstraksi Secara Panas .....	23
2.17	Fraksinasi .....	24
2.18	Kromatografi Kolom .....	24
2.19	Kromatografi Lapis Tipis .....	25
2.20	Uji Aktivitas <i>In Vitro</i> Anti Elastase .....	26
2.21	Mekanisme Penghambatan Kerja Enzim .....	26
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>		<b>30</b>
3.1	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	30
3.2	Peralatan .....	30
3.3	Bahan .....	30
3.4	Cara Kerja .....	31
	3.4.1 Preparasi Struktur Protein Target .....	31
	3.4.2 Mendefinisikan Situs Ikatan dengan Metode Penambatan Buta (Blind Docking) .....	32
	3.4.3 Penapisan Virtual .....	33
	3.4.4 Analisis Hasil Penapisan Virtual .....	33
	3.4.5 Visualisasi Hasil Penapisan Virtual .....	34
	3.4.6 Identifikasi Simplisia .....	34
	3.4.7 Pembuatan Ekstrak .....	34
	3.4.8 Fraksinasi .....	34
	3.4.9 Pemisahan dengan kromatografi kolom .....	34
	3.4.10 Penyiapan Bahan Kimia Uji Aktivitas Enzim Elastase .....	35
	3.4.11 Uji Pendahuluan .....	36
	3.4.12 Perhitungan Aktivitas Enzim .....	38
	3.4.13 Penentuan Penghambatan Aktivitas Elastase .....	38
	3.4.14 Identifikasi Fitokimia .....	39
	3.4.15 Penentuan Kinetika Penghambatan Aktivitas Elastase .....	41
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>42</b>
4.1	Preparasi Struktur Protein Target .....	42
	4.1.1 Pencarian dan Pengunduhan Struktur Protein .....	42
	4.1.2 Optimasi Struktur Protein .....	42
4.2	Mendefinisikan Situs Ikatan dengan Metode Penambatan Buta (Blind Docking) .....	43
4.3	Penapisan Virtual .....	47
4.4	Analisis Hasil Penapisan Virtual .....	48
4.5	Visualisasi Hasil Penapisan Virtual .....	50
4.6	Penyiapan Bahan Uji .....	51
4.7	Ekstraksi .....	52
4.8	Fraksinasi .....	52
4.9	Pemisahan dengan Kromatografi Kolom .....	53
4.10	Uji Pendahuluan Aktivitas Elastase .....	54

4.10.1 Optimasi Aktivitas Elastase dengan Variasi Konsentrasi Substrat.....	55
4.10.2 Optimasi Aktivitas Elastase dengan Variasi Waktu Inkubasi .....	56
4.11 Uji Aktivitas Penghambatan Elastase .....	58
4.12 Penentuan Kinetika Penghambatan Elastase .....	60
4.13 Penapisan Fitokimia .....	61
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>65</b>
5.1 Kesimpulan .....	65
5.2 Saran.....	65
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>66</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Jalur terjadinya penuaan kulit akibat radiasi ultraviolet (+ : induksi; - : penghambatan .....	6
Gambar 2.2	Visualisasi PPE beserta tiga serangkai katalitik yang ditunjukkan dengan batang dan bola (a); visualisasi tiga serangkai katalitik (b) .....	8
Gambar 2.3	Urutan sekuen asam amino dari tropoelastin pada kulit manusia dari basis data <i>protein information resource</i> (PIR)....	9
Gambar 2.4	Tanaman <i>Melaleuca leucadendron</i> L. (kayu putih).....	11
Gambar 2.5	Struktur leucadenon A-D (1-4).....	13
Gambar 2.6	Kromatografi kolom untuk pemisahan komponen ekstrak .....	25
Gambar 2.7	Reaksi N-suksinil-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilin (substrat) dengan elastase (Enzim) .....	26
Gambar 2.8	Plot Lineweaver-Burk inhibisi kompetitif dan nonkompetitif.....	28
Gambar 4.1	Visualisasi PPE dengan ligan dari konfigurasi pada penambatan buta koordinat $x = 5,613$ ; $y = 2,996$ ; $z = 6,269$ dengan gridbox berukuran $126 \times 126 \times 126$ unit (a); visualisasi PPE dengan senyawa sitral (b) .....	44
Gambar 4.2	Visualisasi PPE dengan ligan pada targeting docking kedua dengan gridbox berukuran $80 \times 80 \times 80$ unit dan nilai kordinat $x = 6,028$ ; $y = 5,425$ ; $z = -0,885$ .....	47
Gambar 4.3	Visualisasi 10 senyawa dengan peringkat teratas (a); visualisasi 3 senyawa dengan peringkat teratas dalam bentuk <i>molecular surface</i> (b); visualisasi 3 senyawa dengan peringkat teratas beserta residu asam amino (c).....	51
Gambar 4.4	Pola kromatogram fraksi gabungan .....	54
Gambar 4.5	Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat N-suksinil-ala-ala-ala-p-nitroanilin 0,55 hingga 8,8 mM .....	56
Gambar 4.6	Kurva optimasi aktivitas elastase dengan variasi waktu inkubasi 10, 15 dan 20 menit.....	57
Gambar 4.7	Kurva optimasi aktivitas enzim laccase dengan variasi waktu inkubasi 10 sampai 210 menit .....	57
Gambar 4.8	Perbandingan persen inhibisi asam oleanolat, ekstrak dan fraksi daun <i>Melaleuca leucadendron</i> .....	60
Gambar 4.9	Grafik kinetika inhibisi elastase pada fraksi B (12,5 $\mu\text{g/mL}$ ) .....	61
Gambar 4.10	Kromatogram terpenoid pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. dengan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) disemprot dengan penampak bercak vanilin–asam sulfat diamati secara langsung .....	62
Gambar 4.11	Kromatogram flavonoid pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B, dan C daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. dengan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) disemprot	

dengan Penampak Bercak $\text{AlCl}_3$ 0,5% berfluoresensi kuning pada UV 365 nm.....	63
--	----

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Perbandingan eluen yang digunakan pada kromatografi kolom.....	35
Tabel 3.2	Prosedur optimasi konsentrasi substrat N-suksinil-ala-ala-ala- <i>p</i> nitroanilin.....	37
Tabel 3.3	Prosedur waktu inkubasi.....	38
Tabel 3.4	Prosedur uji penghambatan aktivitas elastase.....	39
Tabel 3.5	Prosedur penentuan kinetika penghambatan enzim elastase ....	41
Tabel 4.1	Senyawa kontrol yang digunakan untuk penambatan buta .....	45
Tabel 4.2	Penambatan bertarget pertama.....	45
Tabel 4.3	Penambatan bertarget kedua .....	46
Tabel 4.4	Penambatan bertarget ketiga.....	46
Tabel 4.5	Hasil penapisan virtual menggunakan AutoDock.....	48
Tabel 4.6	Rendemen hasil ekstrak aseton .....	52
Tabel 4.7	Rendemen hasil fraksi kloroform.....	53
Tabel 4.8	Nilai Rf dan rendemen hasil fraksi kolom gabungan terhadap fraksi kloroform 25 g.....	54
Tabel 4.9	Persen inhibisi asam oleanolat, ekstrak dan fraksi daun <i>Melaleuca leucadendron</i> pada konsentrasi 50, 25 dan 12,5 µg/mL .....	59

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat determinasi tanaman <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	73
Lampiran 2	Penggabungan fraksi kolom berdasarkan pola kromatogram KLT .....	74
Lampiran 3	Tabel optimasi aktivitas enzim dengan variasi substrat N-Succinyl-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> -nitroanilide 0,55; 1,1; 2,2; 4,4; dan 8,8 mM dengan unit larutan enzim 0,08 U/mL, waktu inkubasi 15 menit, suhu inkubasi 25 °C dan pH 8 .....	75
Lampiran 4	Tabel optimasi aktivitas enzim dengan variasi waktu inkubasi 10/15/20 menit dengan konsentrasi substrat 4,4 mM, unit larutan enzim 0,08 U/mL, suhu inkubasi 25 °C dan pH 8.....	76
Lampiran 5	Tabel penghambatan elastase ekstrak aseton daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	77
Lampiran 6	Tabel penghambatan elastase fraksi kloroform daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	78
Lampiran 7	Tabel penghambatan elastase fraksi A daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	79
Lampiran 8	Tabel penghambatan elastase fraksi B daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	80
Lampiran 9	Tabel penghambatan elastase fraksi C daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	81
Lampiran 10	Tabel penghambatan elastase fraksi D daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	82
Lampiran 11	Tabel penghambatan elastase fraksi E daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	83
Lampiran 12	Tabel penghambatan elastase fraksi F daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	84
Lampiran 13	Tabel penghambatan elastase terhadap asam oleanolat.....	85
Lampiran 14	Tabel kinetika penghambatan elastase terhadap fraksi B daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L.....	86
Lampiran 15	Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten fraksi B daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L.....	86
Lampiran 16	Tabel hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L. ....	87
Lampiran 17	Skema kerja uji <i>in silico</i> ... ..	88
Lampiran 18	Skema kerja uji <i>in vitro</i> ... ..	89

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kulit adalah organ penting dari tubuh yang dapat melindungi organ dalam. Kulit merupakan bagian yang paling mudah diamati dengan terjadinya perubahan akibat proses menua. Proses menua akan dialami oleh setiap manusia. Proses ini bersifat dinamis dan merupakan akumulasi secara progresif berbagai perubahan patologis di dalam sel dan jaringan yang terjadi seiring dengan berjalannya waktu. Terdapat dua macam penuaan yaitu penuaan sejati (*true aging*) disebabkan oleh proses fisiologik dan genetik, dan penuaan dini (*photoaging*) yang disebabkan oleh pengaruh lingkungan seperti asap rokok, polutan, dan paparan sinar ultraviolet. Sinar ultraviolet menyebabkan terjadinya perubahan komposisi dari kulit, termasuk penumpukan serat elastis, reduksi kolagen dan degenerasi *glycosaminoglycans* (Moon, Yim, Song, Lee & Hyun, 2010).

Elastin merupakan struktur protein yang penting dari matriks ekstraseluler, yang merupakan komponen utama dari serat elastis, yang memberikan elastisitas pada banyak jaringan termasuk kulit, paru-paru, ligamen dan dinding arteri (Onar et al., 2012). Serat elastis mudah terurai oleh sekresi dan aktivasi elastase yang disebabkan oleh paparan sinar ultraviolet. Penghambatan aktivitas elastase dapat diterapkan sebagai metode untuk melindungi terhadap penuaan kulit (Kim et al., 2010).

Metabolit sekunder dari ekstrak tanaman telah banyak diselidiki dan ditemukan memiliki aktivitas anti elastase dengan menggunakan metode *in vitro*. Polifenol dari teh hijau (*Camellia sinensis*) seperti katekin dan epigalokatekin ditemukan sebagai inhibitor elastase. Polifenol dari daun kesemek (*Diospyros kaki*) menunjukkan aktivitas anti elastase. Aktivitas anti elastase tersebut diduga disebabkan oleh adanya flavonoid dalam ekstrak polifenol dari daun kesemek (*Diospyros kaki*) (Thring, Hili & Naughton, 2009).

Penelitian terhadap inhibitor elastase secara *in vitro* telah dilakukan pada 263 spesies tanaman di Pulau Jeju, Korea Selatan. Dari hasil penelitian tersebut, 192 spesies ekstrak tanaman dengan dosis 500 µg/mL tidak menunjukkan

penghambatan (<30%) pada *porcine pancreatic elastase*. Penghambatan >85% terhadap *porcine pancreatic elastase* ditunjukkan dari 16 spesies ekstrak tanaman termasuk *Cryptomeria japonica*, *Machilus japonica*, *Machilus thunbergii*, *Melia azedarach*, *Euscaphis japonica*, *Viburnum odoratissimum*, *Cornus controversa*, *Cornus walteri*, *Actinodaphne lancifolia*, dan *Taxillus yadoriki* (Moon et al., 2010). Pendekatan *in silico* dilakukan terhadap senyawa minyak esensial sebagai inhibitor elastase. Senyawa sitral menunjukkan hasil ikatan energi yang terendah saat dilakukan docking dengan *porcine pancreatic elastase* yaitu – 4,30 kkal/mol (Sivamani, Singaravelu, Thiagarajan, Jayalakshmi & Kumar, 2012).

Penapisan virtual bertujuan untuk mengurangi secara signifikan jumlah senyawa-senyawa kimia yang perlu disintesis. Sehingga jumlah senyawa untuk diuji aktivitas biologisnya juga akan berkurang (Klebe, 2005). Tanaman yang mengandung senyawa peringkat tertinggi hasil penapisan virtual ditindaklanjuti dengan uji *in vitro* aktivitas penghambatan elastase.

Indonesia yang beriklim tropis merupakan negara dengan keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia setelah Brazil. Indonesia memiliki sekitar 25.000-30.000 spesies tanaman yang merupakan 80% dari jenis tanaman di dunia dan 90% dari jenis tanaman di Asia. Hasil inventarisasi yang dilakukan PT Eisai pada 1986 mendapatkan sekitar tujuh ribu spesies tanaman di Indonesia digunakan masyarakat sebagai obat (Dewoto, 2007). Basis data tanaman obat Indonesia telah dikembangkan di Universitas Indonesia (Yanuar et al., 2011) dan telah dimanfaatkan dalam penapisan virtual untuk pencarian kandidat penghambat HIV-1 (Syahdi, 2012).

Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh kandidat senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor elastase dengan metode *in silico* dan memperoleh prospek tanaman Indonesia yang memiliki potensi sebagai inhibitor elastase yang dapat melindungi terhadap penuaan kulit.

## 1.2. Perumusan Masalah

Dari hasil penelusuran pustaka, belum ada penelitian mengenai penapisan virtual basis data senyawa obat tanaman di Indonesia sebagai inhibitor elastase.

Informasi mengenai penapisan virtual dibutuhkan untuk mengetahui potensi senyawa untuk menjadi inhibitor elastase yang akan ditindaklanjuti dengan uji *in vitro* untuk memperoleh prospek tanaman yang memiliki aktivitas terhadap elastase. Permasalahan penelitian ini secara rinci:

- a. Apa saja senyawa dari basis data bahan alam yang dimiliki yang dinilai termasuk dalam peringkat 10 besar senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor elastase menggunakan penapisan virtual?
- b. Apakah tanaman yang mengandung senyawa yang dinilai memiliki aktivitas sebagai inhibitor elastase pada penapisan virtual juga aktif jika diuji dengan menggunakan metode *in vitro*?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh prospek tanaman Indonesia yang memiliki potensi sebagai inhibitor elastase yang dapat melindungi terhadap penuaan kulit.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- a. Memperoleh data sepuluh senyawa dengan peringkat tertinggi hasil penapisan virtual terhadap elastase.
- b. Memperoleh data aktivitas inhibisi elastase dari fraksi kromatografi kolom yang lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa kontrol.

### **1.4. Manfaat Hasil Penelitian**

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah direkomendasikannya tanaman Indonesia yang berpotensi sebagai inhibitor elastase yang dapat melindungi terhadap penuaan kulit. Bagi peneliti sendiri, penelitian ini dapat meningkatkan pengetahuan dan keterampilan.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Proses Penuaan Kulit**

Kulit merupakan organ tubuh paling besar yang melapisi seluruh bagian tubuh, membungkus daging dan organ-organ yang ada di dalamnya. Kulit pada orang dewasa memiliki luas permukaan antara 1,2-2,2 m<sup>2</sup> dan berat sekitar 5 kg (Khan et al., 2012). Kulit memiliki fungsi melindungi bagian tubuh dari berbagai macam gangguan dan rangsangan luar. Fungsi perlindungan ini terjadi melalui sejumlah mekanisme biologis, seperti pembentukan lapisan tanduk secara terus menerus (keratinisasi dan pelepasan sel-sel kulit ari yang sudah mati), respirasi dan pengaturan suhu tubuh, produksi sebum dan keringat serta pembentukan pigmen melanin untuk melindungi kulit dari bahaya sinar ultraviolet.

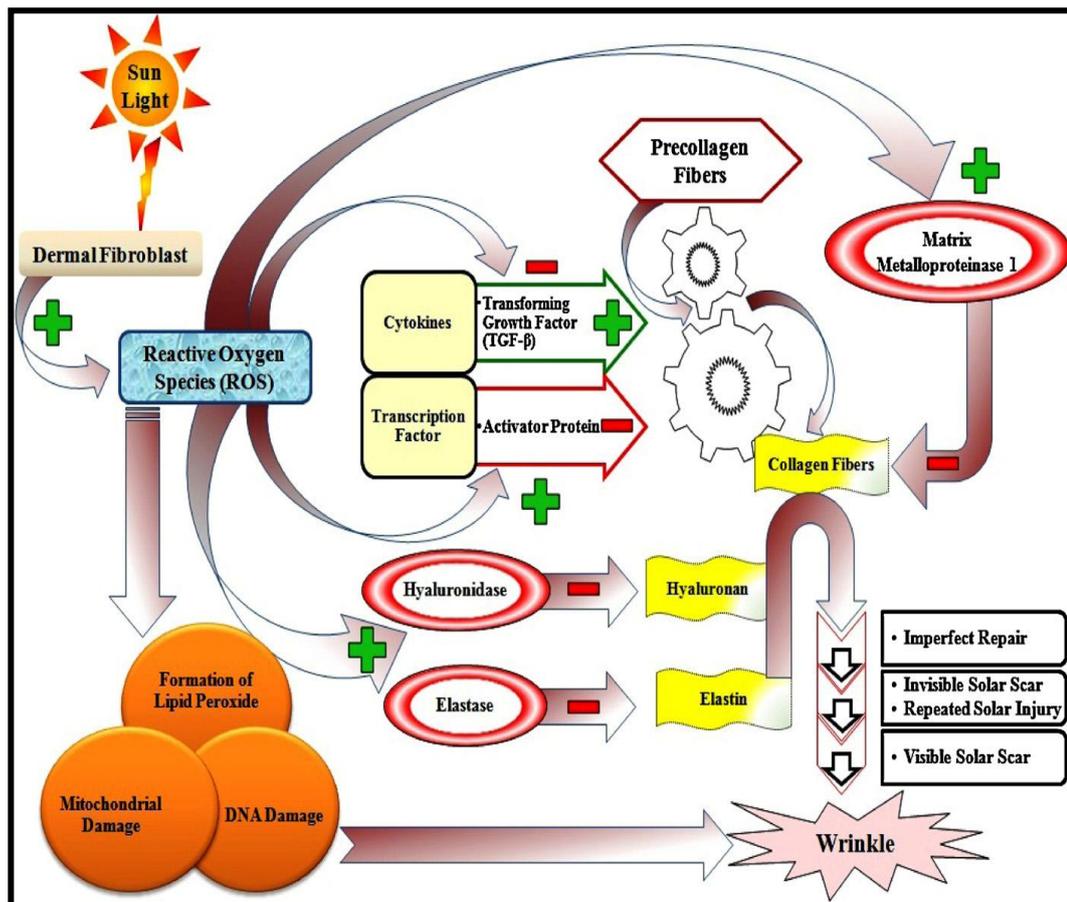
Penuaan kulit terbagi menjadi dua proses yaitu penuaan intrinsik dan ekstrinsik. Penuaan intrinsik adalah proses yang lambat yang menyebabkan perubahan struktur jaringan dan mengganggu fungsi tanpa adanya faktor-faktor biologis, kimia dan fisik. Penuaan intrinsik berlangsung secara alamiah, tidak dapat dicegah dan mengakibatkan perubahan kulit yang menyeluruh sesuai dengan bertambahnya usia, disebabkan oleh berbagai faktor fisiologik dari dalam tubuh sendiri seperti genetik, hormonal dan ras. Pada penuaan intrinsik, kulit tidak terlihat jelas mengalami perubahan. Kulit terlihat lebih pucat, sedikit keriput dan adanya garis ekspresi. Secara fungsional, penuaan intrinsik menyebabkan kulit menjadi lebih kering dan kurang elastis daripada kulit ketika muda (Langton, Sherrat, Griffiths & Watson, 2010).

Radiasi ultraviolet merupakan penyebab utama penuaan ekstrinsik, yaitu paparan sinar matahari atau *fotoaging* yang ditandai dengan kerutan yang lebih dalam dan kasar, kendur dan hiperpigmentasi (Wen, Fan, Tsai, Shih & Chiang, 2012). Pada penuaan ekstrinsik terjadi peningkatan aktivitas enzim proteolitik dan pergantian matrik ekstraseluler abnormal yang berpengaruh terhadap berkurangnya kolagen dan serat elastis sehingga elastisitas kulit menjadi hilang. Sinar ultraviolet mengandung energi foton yang akan memicu reaksi bertingkat dalam jaringan dan sel-sel kulit (Hadi, 2005).

Paparan sinar ultraviolet pada kulit melalui energi fotonnya akan memicu radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS). ROS merupakan sekelompok molekul oksigen reaktif dengan satu atom kelebihan elektron yang sangat reaktif sehingga dapat berikatan dengan molekul lain. *Reactive oxygen species* ini terdiri dari 4 spesies yaitu *superoxid anion* ( $O_2^{\bullet}$ ), *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ), *hydroxyl radicals* ( $OH^{\bullet}$ ), dan *singlet oxygen* ( $^1O_2$ ). Radikal bebas menyebabkan menurunnya antioksidan alamiah tubuh yang selanjutnya akan menyebabkan stres oksidatif, dan apabila stres oksidatif ini berlangsung terus-menerus akan menyebabkan kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif akan menyebabkan kerusakan komponen-komponen intraseluler (Hadi, 2005). ROS juga dapat menginduksi ekspresi proteinase yang bertanggung jawab untuk mengubah matriks ekstraseluler seperti matriks metaloproteinase (MMP) dan protease serin (Thring, Hili & Naughton, 2009).

Terakumulasinya senyawa oksigen reaktif akan meningkatkan MMP-1 dan MMP-3. MMP-1 akan memecah kolagen tipe-1, sedangkan MMP-3 mampu memecah kolagen tipe IV, proteoglikan, fibronektin dan laminin. Rusaknya kolagen tipe I ataupun tipe IV ini akan mengakibatkan penurunan produksi kolagen sehingga kulit menjadi keriput. Hal tersebut merupakan indikator terjadinya penuaan kulit (Wahyono, 2008).

Sistem proteolitik yang terlibat dalam degradasi matriks ekstraseluler adalah protease serin yang salah satunya adalah elastase. Elastase adalah keluarga kimotripsin dari protease yang bertanggung jawab dalam degradasi elastin (Thring, Hili & Naughton, 2009). Elastin merupakan struktur protein yang penting dari matriks ekstraseluler, yang merupakan komponen utama dari serat elastis, yang memberikan elastisitas pada banyak jaringan termasuk kulit, paru-paru, ligamen dan dinding arteri (Onar, Yusufoglu, Turker & Yanardag, 2012). Degradasi elastin yang disebabkan oleh sekresi elastase akan menyebabkan kulit kehilangan elastisitas sehingga menyebabkan kulit menjadi kendur yang merupakan tanda penuaan kulit.



[Sumber: Mukherjee, Maity, Nema & Sarkar, 2011]

**Gambar 2.1.** Jalur terjadinya penuaan kulit akibat radiasi ultraviolet (+ : induksi; - : penghambatan)

## 2.2 Elastase

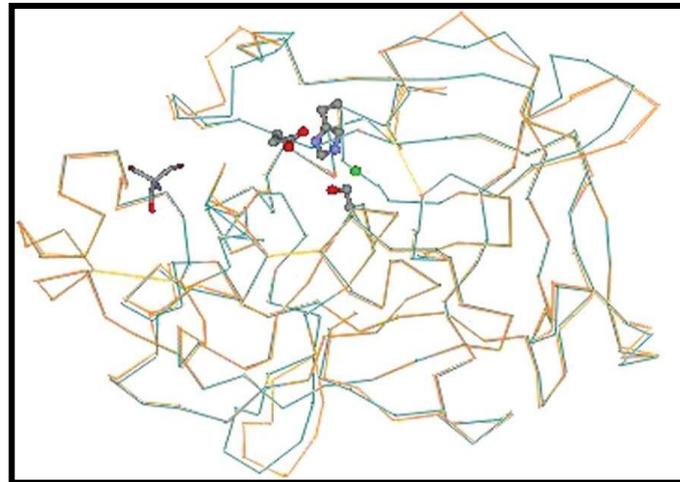
Elastase adalah protease atau enzim proteolitik yang bertanggung jawab memecah protein. Pada elastase terdapat delapan pengkodean gen manusia diantaranya adalah Elastase-1 (CELA-1) dan Elastase-2 (ELANE) yang secara signifikan mengakibatkan penyakit pada manusia. Elastase-1 adalah protease serin dengan spesifisitas substrat yang luas. Hal ini terutama dinyatakan dalam sel keratinosit kulit meskipun pertama kali ditemukan di pankreas. Elastase-1 dapat memotong ikatan peptida yang melibatkan gugus karbonil terutama alanin dan residu asam amino tanpa atau dengan rantai kecil sisi hidrofobik seperti Gly, Val, Leu, Ile. Disisi lain, Elastase-2 memiliki spesifisitas substrat yang sempit dan dinyatakan berupa granul azurophil dari neutrofil yang bertanggung jawab

terhadap *pulmonary emphysema* dan siklus hematopoiesis pada gangguan genetik yang langka (Sivaman, Singaravelu, Thiagarajan, Jayalakshmi & Kumar, 2012).

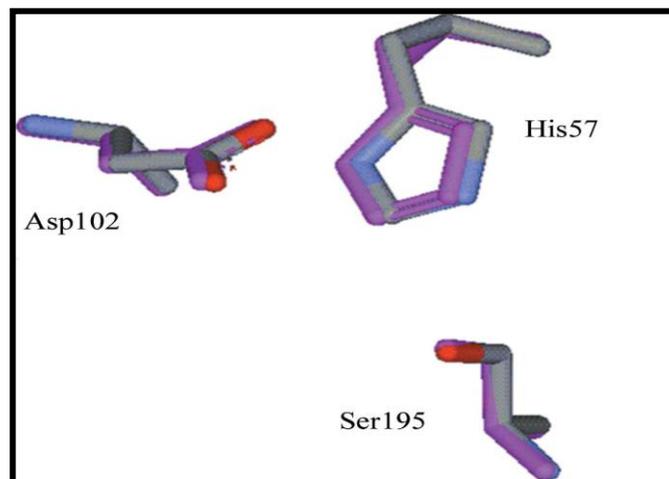
*Elastase pancreatic* merupakan Elastase-1 (CELA-1) berupa protein *compact globular* yang terdiri dari rantai tunggal polipeptida dari 240 asam amino dan dihubungkan oleh 4 jembatan disulfida. *Elastase pancreatic* memiliki inti hidrofobik dan menunjukkan rangkaian homologi yang luas dengan proteinase serin lainnya seperti tripsin dan kimotripsin. Jumlah terbesar *elastase pancreatic* ditemukan pada jaringan pankreas dari mamalia serta burung. Enzim ini juga terdeteksi dalam serum manusia. Elastase tidak mengandung kelompok prostetik atau ion logam dan tidak dipengaruhi aktivator alosterik atau kontrol penghambatan. Aktivitas enzim elastase menghasilkan konformasi tiga dimensi yang memakai rantai tunggal polipeptida. Oleh karena itu, aktivitas enzimatik akan hilang dengan adanya denaturasi dan perubahan konformasi. Degradasi protein oleh *pancreatic elastase* baru-baru ini mengalami kontaminasi oleh kimotripsin dan tripsin. Aktivitas katalitik dari enzim diukur dengan degradasi elastin dan turunan elastin serta hidrolisis dari substrat peptida sintesis. Deteksi secara langsung proteinase dari *porcine pancreas* merupakan kondisi yang optimal untuk penentuan kuantitatif dari *pancreatic elastase* yang telah diteliti memiliki perbedaan yang jelas dengan enzim tripsin dan kimotripsin (Raspi, Spinetti, Brongo, Braca & Sbrana, 2002).

*Porcine pancreatic elastase* (PPE) adalah protease serin yang diklasifikasikan ke dalam keluarga kimotripsin dan terdiri dari 240 asam amino. Protease serin penting untuk mengkatalisis enzim sehingga penting bagi obat dapat menginhibisinya. PPE dapat mengkristal dengan mudah dan karena itu digunakan secara umum untuk studi struktural. Tulang punggung dari struktur PPE kaku tetapi banyak dari inhibitor dalam bentuk kompleks dapat menginduksi pergerakan dari rantai samping (Kinoshita, Yamaguchi & Tada, 2006). Struktur atomik dari PPE dengan resolusi sebesar 1,1 Å telah dilaporkan. Resolusi ditingkatkan untuk memungkinkan penentuan posisi atom dengan akurasi yang tinggi, serta lokalisasi atom H. Tiga residu dapat dimodelkan dalam posisi

alternatif. Tiga serangkaian katalitik dari elastase terdiri dari His57, Asp102 dan Ser195 (Wurtele, Hahn, Hilpert & Hohne, 2000).



(a)



(b)

[Sumber: Kinoshita, Yamaguchi & Tada, 2006]

**Gambar 2.2.** Visualisasi PPE beserta tiga serangkaian katalitik yang ditunjukkan dengan batang dan bola (a); visualisasi tiga serangkaian katalitik (b)

Aktivitas elastase meningkat secara signifikan dengan bertambahnya usia dan disebabkan adanya radikal bebas sehingga mengurangi sifat elastisitas kulit, kulit menua dan kendur (Sokmen et al., 2012). Hal tersebut karena elastase dapat mendegradasi elastin yang merupakan protein matriks ekstraseluler yang memberikan elastisitas pada jaringan ikat. Elastin membentuk serat elastis pada

kulit bagian dermis, dan akan mempengaruhi elastisitas kulit. Kerusakan pada serat elastin menyebabkan elastisitas kulit menurun (Kim et al., 2010).

### 2.3. Elastin

Elastin adalah protein jaringan ikat yang memberikan elastisitas pada kulit, paru-paru, pembuluh darah dan ligamen. Elastin mengandung lebih dari 30% Gly dan sekitar 75% dari seluruh urutan hanya terdiri dari empat hidrofobik amino asam (Gly, Val, Ala, Pro). Elastin pada kulit manusia tidak larut dalam air maupun pelarut organik sehingga penentuan struktur utama elastin mengalami kendala (Getie, Schmelzer & Neubert, 2005). Prekursor elastin yang larut dalam air yaitu tropoelastin yang urutan asam amino dapat ditentukan (Gambar 2.3.).

1	MAGLTAAAPR	PGVLLLLLSI	LHPSRPGGVP	GATpGGVPGG	VFYPGAGLGA
	----- Signal sequence -----				
51	LGGGALGPGG	KPLKPVPGGL	AGAGLGAGLG	AFFAVTFPGA	LVPGGVADAA
101	AAKAAKAGA	GLGGVPCVGG	LGVSAGAVVP	QPGAGVKPKG	VPGVGLPGVY
151	PGGVLPGARE	PGVGVLPpGVp	TGAGVKPKAP	GVGGAFFAGIp	GVGPFGGPOP
201	GVPLGYPIKA	PKLPGGYGLP	YTTGKLPYGY	GPGGVAGAAG	KAGYPTGTGV
251	GPQAAAAAAAA	KAAAKFGAGA	AGVLPGVGGA	GvpGVpGAIp	GIGGLIAGVGT
301	PAAAAAAAAA	AKAAKYGAAA	GLVPGGpGFG	PGVVGVPGAG	VpGVGVpGAG
351	IpVVpGAGIp	GAAVPGVVSF	EAAAKAAAKA	AKYGARFpGVG	VGGIPTYGVG
401	AGGFPGFpGVG	VGGIPGVAGV	pSVGGVpGVG	GVPGVGISPE	AQAAAAAKAA
451	KYGAAGAGVL	GGLVPGPQAA	VPGVPGTGGV	PGVGTAAAA	AKAAAKAAQF
	----- Exon 22 -----				
501	AIINLAGLVP	GVGVARGVGV	ARGVGVARGV	GLAPGVGVAP	GVGVARGVGV
551	APGICpGGVA	AAAKSAAKVA	AKAQLRAAAG	LGAGIpGLGV	GVGVpGLGVG
601	AGVpGLGVGA	GVPFGAGAD	EGVRRSLSP	LREGDPSSSQ	HLPSTPSSPR
	----- Exon 26A -----				
651	VPGALAAAKA	AKYGAAYPGV	LGLGALGGV	GIpGGVVGAG	PAAAAAACA
701	AAKAAQFGLV	GAAGLGGLGV	GGLGVpGVGG	GGIppAAA	KAAYGAAGL
751	GGVLGGAGQF	PLGGVAARPG	FGLSPIFpGG	ACLGKACGRK	RK

[Sumber: Getie, Schmelzer & Neubert, 2005]

**Gambar 2.3.** Urutan sekuen asam amino dari tropoelastin pada kulit manusia dari basis data *protein information resource* (PIR)

Alanin yang terdeteksi dalam tropoelastin pada kulit manusia, menunjukkan bahwa beberapa atau sebagian besar residu alanin dapat didegradasi oleh elastase. Hal tersebut yang menjadi pertimbangan penggunaan substrat sintesis N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin yang memiliki tiga alanin yang nantinya akan di degradasi oleh elastase.

#### 2.4 Herbal dan Senyawa Anti Elastase

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa tanaman yang mengandung antioksidan, polifenol dapat melawan radikal bebas yang dapat menyebabkan penuaan kulit. Herbal kosmetik tumbuh populer tidak hanya di negara-negara Asia tetapi juga di negara lain karena efeknya yang signifikan terhadap penuaan kulit (Mukherjee, Maity, Nema & Sarkar, 2011).

Metabolit sekunder dari ekstrak tanaman telah banyak diselidiki dan ditemukan memiliki aktivitas anti elastase dengan menggunakan metode *in vitro*. Polifenol dari teh hijau (*Camellia sinensis*) seperti katekin dan epigalokatekin ditemukan sebagai inhibitor elastase. Polifenol dari daun kesemek (*Diospyros kaki*) menunjukkan aktivitas anti elastase. Aktivitas anti elastase tersebut di duga disebabkan oleh adanya flavonoid dalam ekstrak polifenol dari daun kesemek (*Diospyros kaki*) (Thring, Hili & Naughton, 2009). Senyawa asam oleanolat memiliki aktivitas elastase dengan nilai IC<sub>50</sub> 3 µg/mL dan digunakan sebagai kontrol positif dalam uji anti elastase (Kim, Byun, Bandi, Hyun & Lee, 2009).

Beberapa kandungan tanaman telah dilaporkan dapat menghambat elastase. Ekstrak kulit kayu *Terminalia arjuna* dengan konsentrasi 800 µg/mL dapat menghambat elastase sebesar 91,58% sedangkan ekstrak buah kering dari *Terminalia chebula* dengan konsentrasi 800 µg/mL dapat menghambat elastase sebesar 82,42% (Satardekar & Deodhar, 2010). Ekstrak *Areca catechu* telah dilaporkan dapat menghambat elastase sebesar 80% pada konsentrasi 100 µg/mL dan sebesar 90% pada konsentrasi 250 µg/mL (Lee & Choi, 1998). Penelitian terhadap inhibitor elastase secara *in vitro* telah dilakukan pada 263 spesies tanaman di Pulau Jeju, Korea Selatan. Dari hasil penelitian tersebut, 192 spesies ekstrak tanaman dengan dosis 500 µg/mL tidak menunjukkan penghambatan

(<30%) pada *porcine pancreatic elastase*. Penghambatan >85% terhadap *porcine pancreatic elastase* ditunjukkan dari 16 spesies ekstrak tanaman termasuk *Cryptomeria japonica*, *Machilus japonica*, *Machilus thunbergii*, *Melia azedarach*, *Euscaphis japonica*, *Viburnum odoratissimum*, *Cornus controversa*, *Cornus walteri*, *Actinodaphne lancifolia*, dan *Taxillus yadoriki* (Moon, Yim, Song, Lee & Hyun, 2010).

## 2.5 *Melaleuca leucadendron* L. (Kayu Putih)



[Sumber: koleksi pribadi]

**Gambar 2.4.** Tanaman *Melaleuca leucadendron* L. (kayu putih)

### 2.5.1 Klasifikasi *Melaleuca leucadendron* L. (IPTEK, 2005)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: Melaleuca

Jenis : *Melaleuca leucadendron* L.

Sinonim : *Melaleuca leucadendra* L.

Nama Daerah : Gelam (Sunda, Jawa); ghelam (Madura); inggolom (Batak); gelam, kayu gelang, kayu putih (Melayu); waru gelang (Sulawesi)

### 2.5.2 Morfologi (IPTEK, 2005)

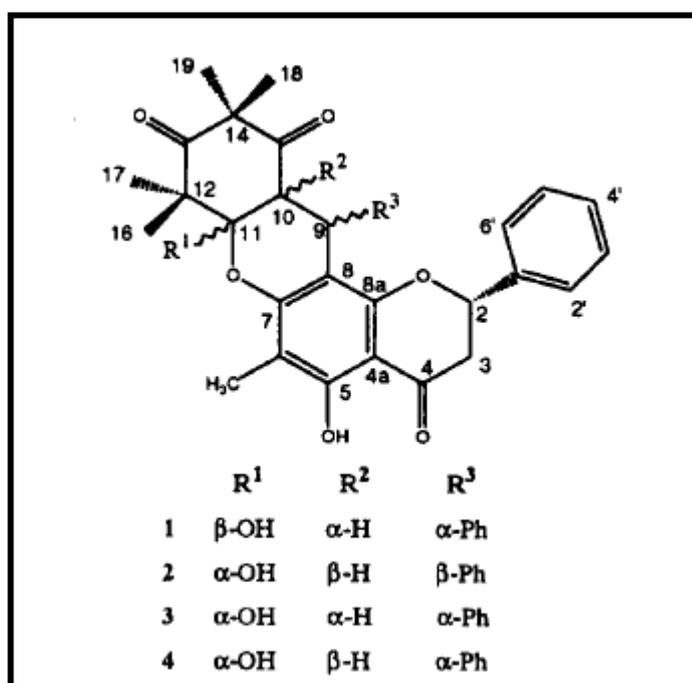
Kayu putih dapat tumbuh di tanah tandus, tahan panas dan dapat bertunas kembali setelah terjadi kebakaran. Tanaman ini dapat ditemukan dari dataran rendah sampai 400 m dpi., dapat tumbuh di dekat pantai di belakang hutan bakau, di tanah berawa atau membentuk hutan kecil di tanah kering sampai basah. Pohon, tinggi 10-20 m, kulit batangnya berlapis-lapis, berwarna putih keabu-abuan dengan permukaan kulit yang terkelupas tidak beraturan. Batang pohonnya tidak terlalu besar, dengan percabangan yang menggantung ke bawah. Daun tunggal, agak tebal seperti kulit, bertangkai pendek, letak berseling. Helai daun berbentuk jorong atau lanset, panjang 4,5-15 cm, lebar 0,75-4 cm, ujung dan pangkalnya runcing, tepi rata, tulang daun hampir sejajar. Permukaan daun berambut, warna hijau kelabu sampai hijau kecoklatan, Daun bila diremas atau dimemarkan berbau minyak kayu putih. Perbungaan majemuk bentuk bulir, bunga berbentuk seperti lonceng, daun mahkota warna putih, kepala putik berwarna putih kekuningan, keluar di ujung percabangan. Buah panjang 2,5-3 mm, lebar 3-4 mm, warnanya coklat muda sampai coklat tua. Bijinya halus, sangat ringan seperti sekam, berwarna kuning.

### 2.5.3 Ekologi, Penyebaran dan Budidaya

Kayu putih tumbuh di Indonesia, Australia, Filipina dan Taiwan. Kayu putih telah dibudidayakan di Indonesia (Ponorogo) sejak tahun 1924 (Budiadi, Kanazawa, Ishii, Sabarnurdin, & Suryanto, 2005). Kayu putih tidak mempunyai syarat tumbuh yang spesifik. Dari ketinggian antara 5 – 450 m di atas permukaan laut, terbukti bahwa tanaman yang satu ini memiliki toleransi yang cukup baik untuk berkembang.

### 2.5.4 Kandungan Kimia

Ekstrak daun *Melaleuca leucadendron* L. mengandung berbagai senyawa triterpenoid yaitu betulinaldehid, asam betulinik, asam  $3\beta$ -asetil-20-en-28-olat, asam 3-oksolup-20(29)-en-28-olat dan asam platanat (Lee, 1998). Ekstrak daun *M. leucadendron* L. mengandung senyawa flavonoid yaitu leucadenon A-D (Lee, 1999). Ekstrak kayu *M. leucadendron* L. mengandung senyawa terpenoid yaitu eupha-7,24-dien- $3\beta,22\beta$ -diol, 20-taraxasten- $3\alpha,28$ -diol,  $3\alpha,27$ -dihidroksi-28,20 $\beta$ -taraxastanolid, dan asam  $3\alpha$ -hidroksi-13(18)-oleanen-27,28-dioik (Lee & Chang, 1999).



[Sumber: Lee, 1999]

**Gambar 2.5.** Struktur leucadenon A-D (1-4)

### 2.5.5 Manfaat

Bagian tanaman kayu putih yang digunakan adalah kulit pohon, daun dan buah. Kulit pohon tanaman kayu putih dapat digunakan sebagai penenang. Buahnya digunakan untuk meningkatkan nafsu makan, karminatif dan obat sakit perut. Daunnya dapat menghilangkan sakit (analgetik), peluruh keringat (diaforetik), anti rheumatik, peluruh kentut (karminatif) dan pereda kolik

(spasmolitik) (IPTEK, 2005). Sebuah penelitian menunjukkan bahwa minyak kayu putih secara *in vitro* dapat sebagai anti jamur, antioksidan dan anti hyaluronidase (Rini, Ohtani & Ichiura, 2012).

## 2.6 Bioinformatika

Bioinformatika memainkan peran yang semakin penting dalam hampir semua penemuan aspek obat, penilaian obat, dan pengembangan obat. Ini semakin penting peranannya karena bioinformatika tidak hanya menangani volume data yang besar, tetapi juga digunakan untuk memprediksi, menganalisa, atau membantu menafsirkan penemuan klinis dan praklinis (Wishart, 2004). Oleh karena itu, bioinformatika dapat didefinisikan sebagai penelitian, pengembangan atau aplikasi dari peralatan komputasi dan pendekatan untuk mengembangkan penggunaan data kesehatan, tingkah laku, medis dan biologis termasuk untuk mendapat, menyimpan, mengarsip dan menganalisis data tersebut (Huerta, Haseltine, Liu, Gregory & Seto, 2000).

Perkembangan bioinformatika dapat memudahkan dalam hal mengakses data penelitian yang akan dianalisa untuk dilanjutkan pada penelitian berikutnya. Data mengenai aktivitas obat sebagai induktor ataupun inhibitor suatu enzim, dapat diperoleh dengan melakukan pencarian situs aktif. Tahapan selanjutnya yaitu perancangan senyawa obat dengan metode berdasarkan struktur melalui *molecular docking* (penambatan molekuler).

## 2.7 Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler (*molecular docking*) merupakan prosedur komputasi yang digunakan untuk memprediksi ikatan non-kovalen dari makromolekul (reseptor) dan molekul kecil (ligan) secara efisien, dimulai dengan struktur masing-masing, struktur yang diperoleh dari simulasi penambatan molekul. Tujuan dari penambatan molekuler adalah untuk memprediksi konformasi dan afinitas ikatan (Trott & Olson, 2009). Proses komputasi akan mencari ligan yang menunjukkan kecocokan geometris (model ikatan paling mungkin) dan kecocokan energi (memprediksi afinitas ikatan).

Untuk memprediksi interaksi ligan-protein, semua program penambatan melakukan dua fungsi utama yakni “penambatan/*docking*” dan “penilaian/*scoring*”. Fungsi pertama mencakup pembuatan konformasi-konformasi ligan-protein. Umumnya, program penambatan melakukan proses pencarian posisi dengan pola ligan yang fleksibel dan protein yang kaku. Setiap posisi dievaluasi (dinilai) berdasarkan bentuk dan karakteristik seperti elektrostatik untuk menemukan posisi yang paling disukai (Okimoto, Futatsugi, Fuji, Suenaga, Atsushi & Morimoto, 2009).

Aspek teoritis mengenai penambatan molekuler dengan memprediksikan posisi suatu ligan [I] pada suatu makromolekul protein [E] di bawah kondisi ekuilibrium (*conformational search*). Dari dua variable tersebut, akan dikalkulasikan (*scoring function*) nilai dari kompleks  $[E+I] = [EI]$  yang dikenal sebagai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ). Energi bebas ikatan berkaitan dengan afinitas ligan terhadap protein (Kitchen et al., 2004). Perubahan energi ini dipengaruhi oleh perubahan entalpi ( $\Delta H$ ) dan perubahan entropi ( $\Delta S$ ). Energi bebas ikatan digambarkan melalui persamaan Gibbs:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

## 2.8 AutoDock

AutoDock adalah peralatan penambatan terautomatisasi. AutoDock didesain untuk memprediksi molekul kecil berikatan dengan reseptor. AutoDock terdiri atas dua program utama yaitu AutoDock yang melakukan penambatan ligan pada suatu set grid yang menggambarkan protein target dan AutoGrid yang memprekalkulasi grid tersebut. AutoDock dilengkapi dengan AutoDock Tools (ADT) yang membantu dalam analisis dan pengaturan penambatan (Morris et al., 2009).

Prosedur asli yang digunakan untuk mengembangkan AutoDock adalah *Monte Carlo simulated annealing*, yaitu teknik untuk mengeksplorasi konfigurasi dengan evaluasi energi yang cepat menggunakan tenaga dari afinitas molekuler berdasarkan basis *grid*. Jadi, teknik ini menggabungkan keuntungan antara pengeksplorasian dalam skala besar dengan evaluasi energi yang kuat. Teknik ini membuktikan pendekatan yang kuat terhadap masalah yang timbul pada

penambatan substrat yang fleksibel pada sisi protein yang statik. Peneliti menentukan volume rektangulard di sekitar protein, ikatan yang dapat dirotasikan untuk substrat, konfigurasi awal acak, dan prosedur yang menghasilkan *docking* yang tidak bias (Olson et al., 2001). Berkas keluaran penambatan menggunakan AutoDock adalah pose dan energi bebas ( $\Delta G$ ) tiap pose tersebut.

## 2.9 Penapisan Virtual

Penapisan virtual (*virtual screening*) adalah penapisan senyawa biologis dengan komputasi atau *in silico* dan dilengkapi dengan proses komputasi kinerja tinggi. Penapisan virtual dapat memanfaatkan beberapa teknik komputasi tergantung pada jumlah dan jenis informasi yang tersedia tentang senyawa dan target. Metode berbasis protein digunakan ketika struktur 3D dari target bioassay diketahui dan teknik komputasi melibatkan *docking* (*virtual binding*), penilaian, calon ligan (bagian dari senyawa yang mampu mengikat) dengan target protein (Schierz, 2009).

Percobaan eksperimental melakukan penapisan biologis jutaan senyawa diperkirakan membutuhkan banyak usaha, sehingga desain rasional obat menggunakan pendekatan komputasi dapat menjadi alternatif (Reddy, Pati, Kumar, Pradeep & Sastry, 2007).

Tujuan utama penapisan virtual adalah mengurangi secara signifikan jumlah senyawa-senyawa kimia yang perlu disintesis. Sehingga jumlah senyawa untuk diuji aktivitas biologisnya juga akan berkurang.

Pendekatan berbasis ligan biasanya digunakan ketika ada senyawa dikenal aktif atau tidak aktif untuk target tertentu. Jika beberapa senyawa aktif diketahui maka teknik kesamaan struktur dapat digunakan. Jika aktivitas beberapa senyawa diketahui maka dapat digunakan sebagai target biologis tertentu dan membuat prediksi pemodelan sehingga dapat digunakan untuk membedakan antara senyawa yang aktif dan tidak aktif. Tujuannya agar pemodelan tersebut dapat diterapkan pada beberapa senyawa lain yang akan ditapis (Schierz, 2009).

Tahap yang penting dalam penapisan virtual mencakup: preparasi struktur protein, preparasi basis data ligan, kalkulasi penambatan dan *pascaproses*.

Langkah yang paling penting untuk penapisan virtual adalah analisis awal dari kantung ikatan dari protein target (Klebe, 2005). Tahap paling awal dari penapisan virtual adalah mempersiapkan struktur protein untuk proses penapisan. Ketika didapatkan lebih dari satu struktur representatif sebagai protein target, harus dilakukan determinasi struktur yang paling sesuai untuk menjadi target penapisan. Perlu diperhatikan bahwa pada struktur protein tanpa ligan, sisi pengikatannya cenderung lebih kecil dan rantai samping residu mungkin tidak mengarah ke bagian yang cocok untuk pengikatan senyawa. Pada beberapa kasus, adanya perubahan struktur protein yang signifikan ketika mengikat suatu inhibitor. Sehingga adanya ligan pada struktur protein memberikan kepastian sisi ikatan telah dioptimasi, orientasi sisi aktifnya sesuai untuk interaksi dengan ligan lainnya (Lyons, Fisher, Varma & Chen, 2005).

### **2.9.1 Struktur Protein untuk Penapisan Virtual**

Struktur 3 dimensi reseptor resolusi skala atom penting untuk memulai eksperimen penambatan ligan ke protein. Pertumbuhan eksponensial data tentang struktur kristal pada beberapa tahun belakangan menyediakan sumber terpercaya untuk struktur protein. Protein Data Bank (PDB) hingga tahun 2011 mencakup hingga lebih dari 70.000 struktur kristal. Perlu diperhatikan, kemungkinan suksesnya penapisan virtual sangat bergantung pada kualitas struktur yang ada. Struktur harus cukup rinci, umumnya dianggap penting untuk memiliki resolusi sekitar 2,5 Å (Jones, Willett, Glen, Leach & Taylor, 1997).

Tiap protein harus dipelajari tersendiri secara teliti sehingga mampu menentukan hasil penapisan virtual yang lebih menjanjikan (Muegge & Enyedy, 2003).

### **2.9.2 Penapisan Virtual menggunakan Autodock**

Tahap pertama yang dilakukan dalam penapisan menggunakan AutoDock adalah pengadaan direktori pustaka yang biasanya telah dikarakterisasi dengan aturan Lipinski melalui empat kriterianya: (1) berat molekul  $< 500$ , (2)  $\log P < 5$ , (3) jumlah donor ikatan hidrogen  $< 5$  dan jumlah akseptor ikatan hidrogen  $< 10$ .

Kemudian ligan diproses menjadi bentuk berkas .pdbqt dengan skrip python `prepare_ligand4.py` dalam modul AutoDock Tools. Kemudian protein target (yang sudah diunduh) juga dipreparasi menjadi bentuk .pdbqt.

Setelah bahan siap, dilakukan preparasi parameter AutoGrid dan pemetaan afinitas atomik dikalkulasi menggunakan AutoGrid. Kemudian dilakukan validasi menggunakan kontrol positif. Lalu mempreparasi direktori penambatan dan berkas parameter untuk ligan. Setelah itu, dilakukan penambatan dan diperiksa hasil yang menarik untuk dianalisis secara visual (Lindstrom, Morris, Weber & Huey, 2008).

## 2.10 Basis Data

Basis data (*database*) adalah kumpulan dari berbagai data yang saling berhubungan satu dengan yang lainnya. Basis data tersimpan di perangkat keras, dengan menggunakan perangkat lunak. Pendefinisian basis data meliputi spesifikasi dari tipe data, struktur dan batasan dari data atau informasi yang akan disimpan. Basis data merupakan salah satu komponen yang penting dalam menyediakan informasi pada para pengguna (*user*).

Keberadaan basis data adalah syarat utama dalam rancangan obat berbasis komputer. Basis data dalam informatika meliputi data sekuen DNA atau protein yang diperoleh melalui percobaan laboratorium yang kemudian disimpan dalam berkas komputer. Setiap berkas sekuen berisi informasi mengenai asal organisme, sekuen, dan nomor akses yang digunakan untuk mengidentifikasi sekuen tersebut. Selain struktur sekuen, makromolekul seperti DNA, RNA dan protein juga dapat direpresentasikan dalam berbagai format yang umum dalam bentuk struktur tiga dimensinya yaitu format PDB (Protein Data Bank) (Yanuar, 2012).

Basis data yang ada saat ini yaitu PDB (Protein Data Bank), ZINC, PubChem, CSD (*Cambridge Structural Database*), *DrugBank* dan HerbalDB. HerbalDB adalah basis data molekul kecil yang berasal dari tanaman obat Indonesia. Basis data ini dikembangkan di Laboratorium Komputasi Biomedik dan Rancangan Obat Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Basis data ini memuat ribuan spesies tanaman obat yang ada di Indonesia, beserta nama daerah,

kandungan senyawa dan struktur molekulnya. Basis data ini dapat di akses dari alamat <http://herbaldb.farmasi.ui.ac.id>. (Yanuar, 2012).

### 2.11 Protein Data Bank

Protein Data Bank (PDB) di Brookhaven National Laboratory (BNL), adalah database yang berisi data eksperimental struktur tiga dimensi dari protein, asam nukleat dan makromolekul biologi lainnya. Protein Data Bank (PDB) telah didirikan sejak tahun 1971. Basis data mengandung koordinat atom, informasi struktur sekunder dan primer, kristalografi data struktur eksperimental, serta hyperlink ke banyak basis data ilmiah lainnya. Para ilmuwan dunia menyumbang struktur untuk PDB dan juga menggunakannya. Hal ini dilakukan untuk membagikan akses informasi yang dibutuhkan yang dapat menghubungkan fungsi biologis makromolekul terhadap struktur tiga dimensi (Sussman et al., 1998).

Penentuan struktur molekul protein yang terdapat pada berkas PDB diperoleh dengan menggunakan data eksperimen. Data eksperimen ini berasal dari kristalografi sinar-X atau spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) dan dilanjutkan dengan program komputer untuk membuat model molekul yang paling sesuai dengan data eksperimen (Yanuar, 2012).

Situs PDB dapat diakses pada alamat <http://www.pdb.org>, yang dikelola oleh sebuah organisasi yaitu wwPDB (*Worldwide Protein Data Bank*). wwPDB terdiri dari organisasi-organisasi yang bekerja sebagai pusat pengumpulan, pemrosesan data, dan distribusi data di PDB antara lain RSCB PDB, BRMB (Amerika Serikat), PDBe (Eropa) dan PDBj (Jepang).

### 2.12 VegaZZ

VegaZZ merupakan sebuah evolusi terkenal yang dirilis berdasarkan sebuah aplikasi komputer *VEGA OpenGL package* yang di dalamnya terdapat beberapa materi baru untuk memudahkan pengguna dalam melakukan penelitian, khususnya berkaitan dengan suatu pemodelan kimia. VegaZZ dapat beroperasi pada sistem Windows sebagai suatu pemodelan molekuler yang lengkap. VegaZZ dapat digunakan untuk pembacaan, analisis dan visualisasi lintasan dinamika

molekuler, analisis kluster dari data lintasan secara tiga dimensi (VegaZZ-Molecular Modeling Toolkit for Windows, 2006).

### 2.13 OpenBabel

OpenBabel merupakan *software* yang dirancang untuk memproses data senyawa kimia yang berbeda. Hal ini memungkinkan untuk mencari, mengkonversi, menganalisis, atau menyimpan data dari pemodelan molekul, kimia, bahan *solid-state* dan biokimia. OpenBabel dapat mengkonversi lebih dari 110 format kimia file, membaca 82 format dan menulis 85 format. OpenBabel mencakup format yang digunakan dalam kimiawi (SMILES, InChI, MOL, MOL2); file input dan file dari berbagai komputasi kimia (GAMESS, Gaussian, Mopac); format file kristalografi (CIF, ShelX), format reaksi (MDL rxn); format file yang digunakan oleh dinamika molekul dan docking (AutoDock, Amber); format yang digunakan oleh gambar 2D (Chem-Draw) dan 3D (Chem3D, Molden); kinetika kimia dan termodinamika (ChemKin, Thermo) (O'Boyle et al., 2011).

OpenBabel tersedia secara bebas dan dapat diakses dari <http://openbabel.org/> serta terbuka terhadap anggota komunitas baru sangat (pengguna, pengembang, dan pemohon fitur). Untuk informasi tentang cara menggunakan OpenBabel, silakan lihat dari alamat <http://openbabel.org/docs/current/> (O'Boyle et al., 2011).

### 2.14 PyRx

PyRx adalah piranti lunak tambahan (*addons*) penapisan virtual yang dapat digunakan untuk penapisan pustaka senyawa. PyRx memungkinkan pengguna untuk menjalankan penapisan virtual dalam berbagai platform dan membantu pengguna dalam setiap tahap proses. Proses yang dapat dilakukan menggunakan piranti lunak ini mencakup preparasi data ligan dan makromolekul, melakukan kalkulasi serta analisis hasil. PyRx dikembangkan oleh *Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute* (Dallakyan, 2009). PyRx memudahkan pengguna melakukan pekerjaan penapisan virtual. Penapisan

dapat dilakukan secara lokal (menggunakan GPU ataupun kluster) atau secara *remote* menggunakan servis web Opal toolkit.

### 2.15 PyMOL

PyMOL merupakan salah satu perangkat lunak visualisasi yang digunakan untuk memahami suatu struktur dan dapat menghasilkan gambar tiga dimensi yang berkualitas dari suatu molekul kecil maupun makromolekul seperti protein. Visualisasi sangatlah penting untuk lebih memahami dan mendalami struktur suatu molekul dan PyMOL merupakan salah satu perangkat lunak visualisasi yang mampu menyajikan tampilan struktur dalam beberapa warna. Beberapa tahun terakhir ini, sistem grafik molekuler PyMOL telah berkembang menjadi penampil molekuler yang kuat dengan adanya kekurangan dari tampilan 3D sehingga dapat digunakan untuk beberapa perangkat lunak dan aplikasi. Melalui pengaturan tampilan yang bermacam-macam serta penggunaan bahasa *Python* dalam level yang kuat untuk objek, menjadikan perangkat lunak ini menjadi mudah untuk dipergunakan secara luas tanpa mengubah kode-kode utama. Perangkat lunak ini dikomersilkan oleh DeLano Scientific LLC (Delano, 2004).

### 2.16 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Dirjen POM, 1986).

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut.

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau

serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Sebagian ekstrak dibuat dengan bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh ekstrak biasanya dipekatkan secara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan sesedikit mungkin terkena panas (Depkes, 1995).

Ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan cara dingin dan cara panas. Ekstraksi secara dingin yaitu maserasi dan perkolasi. Ekstraksi secara panas yaitu refluks, sokletasi, dan destilasi uap (Sudjadi, 1988).

### **2.16.1 Ekstraksi Secara Dingin**

#### **2.16.1.1 Maserasi**

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Metode maserasi digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, tiraks, dan lilin.

Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya sederhana. Sedangkan kerugiannya antara lain waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak dapat digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks, dan lilin.

#### **2.16.1.2 Perkolasi**

Perkolasi adalah cara penyarian dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Keuntungan metode ini adalah tidak memerlukan langkah tambahan yaitu sampel padat telah pisah dari ekstrak. Kerugiannya kontak antara sampel padat tidak merata atau terbatas dibandingkan dengan metode refluks dan pelarut menjadi dingin selama proses perkolasi sehingga tidak melarutkan komponen secara efisien.

## 2.16.2 Ekstraksi Secara Panas

### 2.16.2.1 Refluks

Penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara sampel dimasukkan ke dalam labu alas bulat bersama-sama dengan cairan penyari lalu dipanaskan, uap- uap cairan penyari terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat, demikian seterusnya berlangsung secara berkesinambungan sampai penyarian sempurna, penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan.

Keuntungan dari metode ini adalah digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung. Kerugiannya adalah membutuhkan volume total pelarut yang besar dan sejumlah manipulasi dari operator.

### 2.16.2.2 Sokletasi

Sokletasi merupakan penyarian simplisia secara berkesinambungan, cairan penyari dipanaskan hingga menguap, uap cairan penyari terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dalam klonsong dan selanjutnya masuk kembali kedalam labu bulat setelah melewati pipa sifon. Keuntungan metode ini adalah :

- a. Dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung
- b. Digunakan pelarut yang lebih sedikit
- c. Pemanasannya dapat diatur

Kerugian dari metode ini adalah:

- a. Karena pelarut didaur ulang, ekstrak yang terkumpul pada wadah sebelah bawah terus menerus dipanaskan sehingga dapat menyebabkan reaksi uraian oleh panas
- b. Jumlah total senyawa-senyawa yang diekstraksi akan melampaui kelarutannya dalam pelarut tertentu sehingga dapat mengendap dalam wadah dan membutuhkan volume pelarut yang lebih banyak untuk melarutkannya.

### 2.16.2.3 Destilasi Uap

Destilasi uap adalah metode yang populer untuk ekstraksi minyak-minyak menguap (esensial) dari sampel tanaman. Metode destilasi uap air diperuntukkan untuk menyari simplisia yang mengandung minyak menguap atau mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal.

Penyarian minyak menguap dengan cara simplisia dan air ditempatkan dalam labu berbeda. Air dipanaskan dan akan menguap, uap air akan masuk ke dalam labu sampel sambil mengekstraksi minyak menguap yang terdapat dalam simplisia, uap air dan minyak menguap yang telah terekstraksi menuju kondensor dan akan terkondensasi, lalu akan melewati pipa alonga, campuran air dan minyak menguap akan masuk ke dalam corong pisah, dan akan memisah antara air dan minyak atsiri.

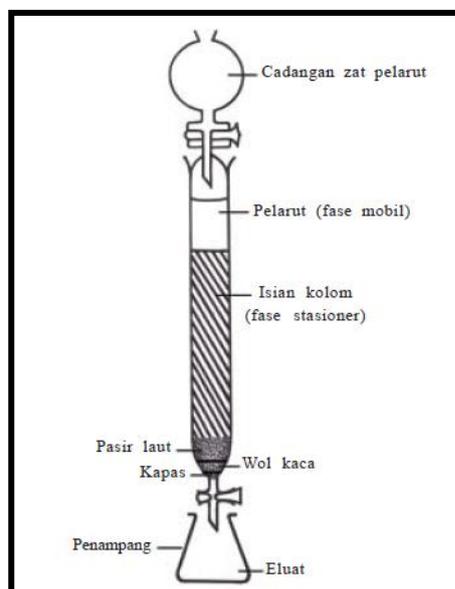
## 2.17 Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaian. Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada diatas. Fraksinasi bertingkat biasanya menggunakan pelarut organik seperti heksana, etil asetat eter, aseton, kloroform, diklorometana, atau campuran pelarut tersebut. Asam lemak, asam resin, tanin, dan zat warna adalah bahan yang penting dan dapat diekstraksi dengan pelarut organik (Adijuwana & Nur, 1989).

## 2.18 Kromatografi Kolom

Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase stasioner dan cairan (pereaksi) sebagai fase mobil untuk mengetahui banyaknya komponen contoh yang keluar melalui kolom. Pengisian kolom dilakukan dengan memasukkan adsorben dalam bentuk larutan dan partikelnya dibiarkan mengendap. Pemisahan komponen ekstrak secara

kromatografi kolom bertujuan untuk mengetahui komponen-komponen senyawa kimia yang dapat terpisah dan kandungan senyawa aktifnya (Hayani, 2007).



[Sumber: Hayani, 2007]

**Gambar 2.6.** Kromatografi kolom untuk pemisahan komponen ekstrak

### 2.19 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan komponen-komponen dengan adanya perbedaan adsorpsi atau partisi antara fasa diam dan fasa gerak. Kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Gel silika gel atau alumina merupakan fase diam. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran yang sesuai (Sudjadi, 1988).

Noda-noda kromatografi lapis tipis dapat divisualisasikan secara fisika dan kimia. Visualisasi secara fisika dilakukan dengan mengamati hasil noda kromatogram yang mengabsorpsi radiasi UV. Sedangkan visualisasi secara kimia dilakukan dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna, contohnya reagensia Dragendroff, Liebermann-Buchard,  $\text{FeCl}_3$  1% dan  $\text{CeSO}_4$  1%.

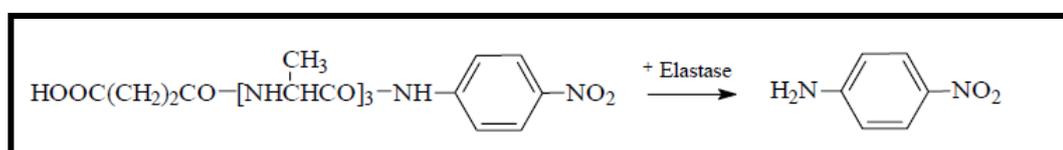
Identifikasi senyawa-senyawa yang muncul pada kromatogram dapat diukur dengan menghitung faktor retensi ( $R_f$ ). Faktor retensi merupakan perbandingan jarak migrasi komponen senyawa dengan jarak migrasi fasa gerak

dari titik asal (titik saat sampel diletakkan pada pelat KLT). Faktor retensi untuk setiap warna kromatogram dihitung dengan rumus sebagai berikut (Sudjadi, 1988):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}} \quad \dots\dots\dots (2.1)$$

## 2.20 Uji Aktivitas *In Vitro* Anti Elastase

Aktivitas anti elastase didasarkan pada reaksi antara N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin (substrat) dengan elastase (enzim). Elastase adalah enzim yang dapat mendegradasi elastin sehingga akan menginduksi penurunan elastisitas dan fleksibilitas kulit. Substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin dipilih karena memiliki aktivitas proteolitik yang spesifik untuk *pancreatic elastase*. Tes ini menggunakan substrat tidak berwarna yang nantinya akan didegradasi oleh enzim. Hasil reaksi akan menghasilkan *p*-nitroanilin yang berwarna kuning. Penambahan inhibitor elastase akan menyebabkan terjadinya penurunan degradasi substrat oleh enzim.



**Gambar 2.7.** Reaksi N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin (substrat) dengan elastase (enzim)

## 2.21 Mekanisme Penghambatan Kerja Enzim

Substansi apapun yang dapat mengurangi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim disebut sebagai penghambat (*inhibitor*). Penghambat *reversible* berikatan dengan enzim melalui ikatan nonkovalen. Pengenceran dari kompleks enzim-penghambat dapat melepaskan ikatan tersebut dan mengembalikan aktivitas enzim. Penghambatan *irreversible* terjadi ketika pada pengenceran kompleks enzim-penghambat, ikatan tidak dapat terlepas atau setelah pelepasan enzim yang dihambat tidak aktif kembali (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

Terdapat dua tipe penghambatan enzim *reversible* yang paling sering ditemui, yaitu:

a. Penghambatan kompetitif

Tipe penghambatan ini terjadi ketika penghambat secara *reversible* berikatan dengan sisi aktif enzim dimana yang secara normal ditempati oleh substrat. Penghambat bersaing dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim tersebut (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

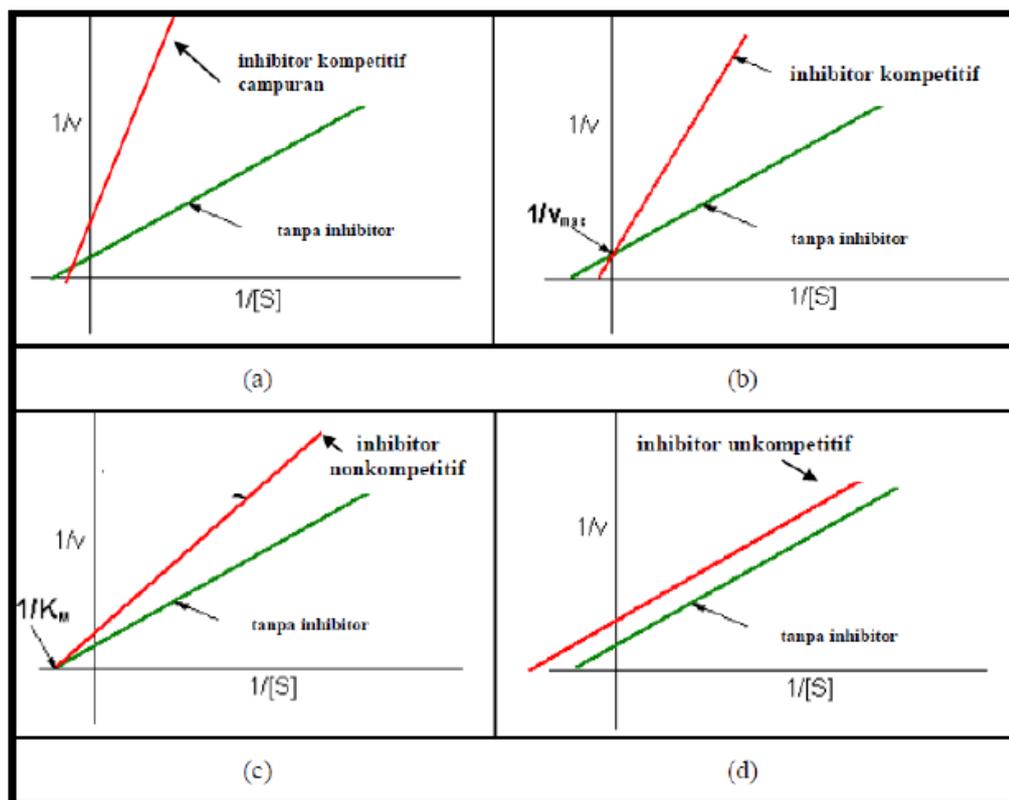
b. Penghambatan nonkompetitif

Pada tipe penghambatan ini, penghambat tidak terikat pada sisi aktif enzim, tetapi terikat pada bagian lain enzim. Terikatnya penghambat pada enzim menyebabkan perubahan bentuk enzim yang mengakibatkan penurunan aktivitas enzim. Karena penghambat terikat pada sisi yang berbeda dari substrat, maka enzim dapat berikatan dengan penghambat dan substrat secara bersama-sama (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

Selain penghambat kompetitif dan nonkompetitif, dikenal juga penghambat unkompetitif. Penghambat jenis ini tidak berikatan dengan enzim bebas, namun berikatan dengan enzim yang telah terikat dengan substrat. Tidak ada kompleks enzim-penghambat yang terbentuk. Ikatan dengan substrat menyebabkan perubahan konformasi yang membentuk tempat untuk ikatan dengan penghambat (McPherson & Pincus, 2007).

Mekanisme penghambatan kerja enzim dapat diperkirakan melalui penentuan kinetika penghambatan enzim. Penentuan kinetika meliputi penentuan nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan plot Lineweaver-Burke. Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) adalah karakteristik dari suatu enzim dan substratnya. Nilai  $K_M$  menunjukkan afinitas enzim dengan substrat sehingga nilai  $K_M$  sebanding dengan konsentrasi substrat. Sedangkan plot Lineweaver-Burke adalah plot kurva substrat-penghambat dan substrat-tanpa penghambat dengan  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan  $1/V_o$  sebagai sumbu y. S adalah variasi konsentrasi substrat sedangkan  $V_o$  adalah kecepatan inisial (*initial velocity*) atau kecepatan awal (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

Penghambat kompetitif memiliki nilai  $K_M$  yang meningkat dan  $V_{max}$  (kecepatan maksimal) yang sama dibandingkan tanpa penghambat, sedangkan penghambat nonkompetitif memiliki nilai  $K_M$  yang sama dan  $V_{max}$  yang menurun dibandingkan dengan tanpa penghambat. Adanya penghambat yang bersifat kompetitif campuran akan menyebabkan nilai  $K_m$  bertambah karena afinitas enzim terhadap substrat semakin berkurang akibat adanya perubahan bentuk pada sisi enzim, sedangkan nilai  $V_{max}$  akan turun karena ikatan enzim dengan substrat menjadi tidak optimal. Pada penghambat unkompetitif, nilai  $K_m$  berkurang disebabkan oleh besarnya afinitas enzim terhadap substrat, sedangkan berkurangnya nilai  $V_{max}$  disebabkan oleh adanya penghambat yang berikatan dengan kompleks enzim substrat (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).



[Sumber: Murray et al., 2009]

**Gambar 2.8.** Plot Lineweaver-Burk inhibisi kompetitif campuran (a); inhibisi kompetitif (b); nonkompetitif (c); dan unkompetitif (d)

Plot Lineweaver-Burk adalah plot kurva substrat-penghambat dan substrat-tanpa penghambat. Perbedaan plot Lineweaver-Burk antara penghambat kompetitif, nonkompetitif, kompetitif campuran dan unkompetitif dapat dilihat pada Gambar 2.8. Kurva penghambat kompetitif dan kurva tanpa penghambat akan berpotongan di sumbu y. Kurva penghambat nonkompetitif dan kurva tanpa penghambat akan berpotongan di sumbu x. Kurva penghambat kompetitif campuran dan kurva tanpa penghambat akan berpotongan di kuadran II. Sedangkan kurva penghambat unkompetitif dan kurva tanpa penghambat tidak berpotongan di sumbu x maupun sumbu y (Murray et al., 2009).

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Komputasi Biomedik dan Rancangan Obat, Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Kimia Kuantitatif, dan Laboratorium BA/BE, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok. Penelitian dimulai dari Agustus -November 2012.

#### 3.2 Peralatan

##### 3.2.1 Piranti Keras

Piranti keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah komputer dengan spesifikasi *Random Access Memory* 4 GB, prosesor Quad Core (Intel® Core™), *graphic card* NVIDIA Ge Force GTX 295 Piranti keras kelengkapan komputer: monitor, mouse, CPU, keyboard. Komputer terhubung ke UPS (*uninterrupted power supply*) dan *online* internet.

##### 3.2.2 Piranti lunak

Piranti lunak yang digunakan dalam penelitian ini adalah OpenBabel, VegaZZ versi 2.4.0.25, PyRx 0.8, PyMOL, AutoDock.

##### 3.2.3 Alat Laboratorium

Alat-alat gelas Pyrex, pipet, kaca arloji, plat tetes, plat KLT, *chamber*, alat penyemprot, cawan petri, rak tabung reaksi, timbangan analitik, neraca analitik, *waterbath*, *rotary evaporator*, *vacuum pump*, peralatan kromatografi kolom, bejana KLT, pipa kepiler, vial dan botol penampung berbagai ukuran, pH meter, *shaker*, mikropipet, *96-well Microplate Reader*.

#### 3.3 Bahan

##### 3.3.1 Uji *In Silico*

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah basis data struktur kristal 3 dimensi dari *porcine pancreatic elastase* (1QNJ) diunduh dari RCSB

PDB (Sivamani, 2012); senyawa yang ditambahkan berupa struktur tiga dimensi senyawa obat dari basis data tanaman obat Farmasi Universitas Indonesia; struktur tiga dimensi kontrol positif yaitu senyawa sitral, sitronelal, timol, geraniol, epigalokatekin dan asam oleanolat.

### 3.3.2 Uji *In Vitro*

Daun segar *Melaleuca leucadendron* L. yang berasal dari Kampoeng Djamoe Organik Martha Tilaar Cikarang, aqua demineralisasi, aseton, n-heksana, etil asetat, kloroform, basa trizma (Sigma, T1503), asam klorida, dimetilsulfoksida (DMSO), asam asetat, *porcine pancreatic elastase* [PPE (Type IV); Sigma, E0258), substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin (Sigma, S4760), asam oleanolat (Aldrich, O5504), pereaksi Bouchardat, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, metanol, alumunium klorida, vanillin-asam sulfat, gelatin, simplisia *Chinae Korteks*, *Orthosiphonis Folium*, *Caryophylli Flos*, *Psidii Folium* dan *Liquiritiae Radix*.

## 3.4 Cara Kerja

### 3.4.1 Preparasi Struktur Protein Target

Struktur dipreparasi untuk persiapan penambatan. Proses preparasi yang dilakukan mencakup pencarian dan pengunduhan, optimasi dan pemisahan dari residu nonstandar.

#### 3.4.1.1 Pencarian dan Pengunduhan Struktur Protein

Struktur makromolekul target (protein *porcine pancreatic elastase*/1QNJ) yang akan digunakan dicari pada situs web PDB. Makromolekul yang dipilih memiliki resolusi 1,1 Å dan rantai lengkap. Makromolekul diunduh dalam format teks.sdf lalu di konversi dengan OpenBabel menjadi teks.pdb.

#### 3.4.1.2 Optimasi Struktur Protein

Optimasi struktur tiga dimensi dilakukan dengan VegaZZ untuk penapisan dengan AutoDock. Optimasi yang dilakukan berupa penghapusan molekul

pelarut, ion  $\text{Na}^+$  dan ion  $\text{SO}_4^{2-}$ , penambahan muatan dengan muatan parsial *Gasteiger* dan penerapan medan gaya (*forcefield*) AutoDock serta melakukan minimisasi konformasi.

### 3.4.2 Mendefinisikan Situs Ikatan dengan Metode Penambatan Buta (*Blind Docking*)

Untuk mendefinisikan situs ikatan dilakukan dengan penambatan menggunakan kontrol positif yang didapat dari struktur kristal data bank protein. Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa sitral, sitronelal, tymol, geraniol yang telah uji secara *in silico* sebagai inhibitor elastase (Sivamani, Singaravelu, Thiagarajan, Jayalakshmi & Kumar, 2012). Selain itu, senyawa epigalokatekin digunakan sebagai kontrol positif secara *in vitro* pada penghambatan elastase (Thring, Hili & Naughton, 2009) dan senyawa asam oleanolat sebagai kontrol positif secara *in vitro* pada penghambatan elastase (Kim, Byun, Bandi, Hyun & Lee, 2009). Penambatan buta menggunakan senyawa kontrol dilakukan menggunakan tahap berikut:

- a. Struktur tiga dimensi senyawa kontrol dicari pada Pubchem

Struktur senyawa dijelajah dari situs web Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.gov>). Senyawa kontrol diunduh dalam format teks.sdf lalu di konversi dengan Open Babel menjadi teks.pdb.

- b. Optimasi tiga dimensi

Gambar tiga dimensi diberi penambahan muatan parsial *gasteiger*, dan minimisasi energi menggunakan *steepest descent* dan *conjugate gradient* 1000 langkah. Struktur tiga dimensi disimpan dalam format pdbqt.

- c. Senyawa kontrol ditambatkan ke target penapisan virtual

Metode yang dilakukan merupakan penambatan buta (*blind docking*) dengan Autodock 4.0. Untuk pendefinisian situs penambatan dan dilanjutkan dengan penambatan molekuler bertarget.

### 3.4.3 Penapisan Virtual

Pada penelitian ini dilakukan penapisan virtual menggunakan penambatan molekuler. Penapisan dilakukan pada enzim menggunakan piranti lunak. Prosedur yang dilakukan untuk penapisan virtual menggunakan AutoDock dengan bantuan piranti lunak PyRx adalah sebagai berikut:

a. Preparasi ligan

Pada antarmuka PyRx opsi *add ligand* dipilih, kemudian berkas semua ligan .pdbqt yang akan digunakan dimasukkan.

b. Preparasi makromolekul

Pada antarmuka PyRx, opsi *add macromolecule* dipilih, kemudian struktur makromolekul .pdbqt yang menjadi target dimasukkan.

c. Penjalanan AutoGrid

Pemetaan grid dilakukan pada situs ikatan makromolekul yang didefinisikan sebelumnya untuk tiap makromolekul. Jejaring grid sebesar 80 x 80 x 80 unit untuk AutoDock. Opsi *forward* / *run AutoGrid* dipilih untuk menjalankan kalkulasi Grid.

d. Penjalanan AutoDock

Parameter penambatan diatur sebelum melakukan penapisan. Opsi *Lamarckian GA* dipilih dan *maximum number of energy evaluations* diubah menjadi 250.000. Parameter lain menggunakan pengaturan *default* penambatan AutoDock. Pilih “*Forward*” untuk memulai komputasi penambatan berseri.

### 3.4.4 Analisis Hasil Penapisan Virtual

Berdasarkan hasil penambatan tiap pendekatan, dibuat pemeringkatan senyawa dengan konformasi 10 besar terhadap enzim. Hasil pemeringkatan penapisan virtual menggunakan AutoDock akan disimpan dalam berkas .dlg dan berupa kluster / kelompok posisi senyawa dalam rentang energi ikatan tertentu. Setiap senyawa yang muncul dalam peringkat 10 besar penapisan ditelusuri asal spesiesnya menggunakan basis data herbaldb.

#### 3.4.5 Visualisasi Hasil Penapisan Virtual

Hasil pemeringkatan penapisan virtual menggunakan AutoDock dapat divisualisasi dengan menggunakan PyMOL setelah dilakukan konversi menggunakan program preparasi visualisasi untuk mengambil konformasi dari kluster yang dibuat AutoDock.

#### 3.4.6 Identifikasi Simplisia

Identitas tanaman meliputi nama latin dan nama Indonesia bagian tumbuhan yang digunakan dan nama simplisia dilakukan di LIPI Cibinong.

#### 3.4.7 Pembuatan Ekstrak

Daun segar *Melaleuca leucadendron* L. sebanyak 2 kg diekstrak dengan metode maserasi selama 24 jam menggunakan pelarut aseton sebanyak 20 L. Hasil larutan maserasi di saring dan filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu dan tekanan yang sesuai hingga diperoleh ekstrak aseton.

#### 3.4.8 Fraksinasi

Ekstrak aseton sebanyak 50 g difraksinasi menggunakan corong pisah. Sebelum difraksinasi, ekstrak aseton didispersikan dengan air panas sebanyak 500 mL, kemudian dipartisi dengan menambahkan kloroform sebanyak 1,1 L. Fraksinasi dilakukan sebanyak tiga kali. Lapisan kloroform diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu dan tekanan yang sesuai hingga diperoleh fraksi kloroform.

#### 3.4.9 Pemisahan dengan kromatografi kolom

Fraksi kloroform dari hasil fraksinasi cair-cair ekstrak aseton dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom cair vakum untuk memisahkan senyawa dalam waktu yang lebih singkat dengan menggunakan silika gel sebagai absorbent dan berbagai perbandingan pelarut (elusi gradien), serta menggunakan pompa vakum untuk mempercepat penarikan eluen. Kolom kromatografi disiapkan

dengan memasukkan 100 g silika gel dengan keadaan vakum agar diperoleh kerapatan maksimum. Fraksi kloroform ditimbang sebanyak 25 g, kemudian ditambahkan silika gel sebanyak 25 g lalu dihomogenkan. Setelah itu, campuran fraksi kloroform dan silika gel tersebut dimasukkan ke dalam kolom sambil divakum lalu diratakan. Kemudian dielusi dengan perbandingan eluen yang ditentukan (lihat Tabel 3.1).

**Tabel 3.1.** Perbandingan eluen yang digunakan pada kromatografi kolom

Fraksi	n- Heksana (mL)	Etil Asetat (mL)
1	300	0
2	270	30
3	240	60
4	210	90
5	180	120
6	150	150
7	120	180
8	90	210
9	60	240
10	30	270
11	0	300

Pada tahap pemisahan dengan kromatografi kolom cair vakum diperoleh 22 fraksi kemudian fraksi-fraksi tersebut digabung berdasarkan kesamaan pola pada kromatogram KLT sehingga diperoleh 6 fraksi gabungan (A-F).

#### 3.4.10 Penyiapan Bahan Kimia Uji Aktivitas Elastase

##### a. Pembuatan larutan 100 mM dapar Tris-HCl dengan pH 8

Larutan dapar dibuat dengan menyiapkan larutan basa trizma 1,211 g dalam air bebas CO<sub>2</sub> dan ditambahkan sedikit demi sedikit 1 M HCl disertai pengecekan setiap kali penambahan 1 M HCl hingga tercapai pH 8, lalu volume dicukupkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> hingga 100 mL.

- b. Pembuatan larutan substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin 8,8; 4,4; 2,2; 1,1; 0,55 dan 0,275

Larutan substrat dibuat dengan cara melarutkan 20 mg N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin dalam 5 mL pelarut 100 mM dapar Tris-HCl pH 8 sehingga diperoleh larutan substrat 8,8 mM. larutan substrat diencerkan dengan pelarut 100 mM dapar Tris-HCl pH 8 hingga diperoleh larutan substrat 4,4; 2,2; 1,1; 0,55 dan 0,275.

- c. Pembuatan larutan enzim *porcine pancreatic elastase*

Larutan enzim dibuat dengan melarutkan 1,43 mg yang terdapat dalam botol kemasan dalam 10 mL pelarut 100 mM dapar Tris-HCl pH 8 dingin hingga diperoleh larutan enzim 0,6435 U/mL. Kemudian dipipet 250  $\mu$ L larutan enzim 0,6435 U/mL lalu ditambahkan 100 mM dapar Tris-HCl pH 8 dingin hingga volume 2 mL dan diperoleh larutan enzim 0,08 U/mL.

- d. Pembuatan larutan asam oleanolat

larutan asam oleanolat dengan konsentrasi 1000  $\mu$ g/mL dibuat dengan melarutkan 10 mg dalam 10 mL DMSO. Kemudian larutan asam oleanolat dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Volume labu ukur dicukupkan dengan larutan DMSO hingga diperoleh konsentrasi 200  $\mu$ g/mL. Selanjutnya di buat larutan asam oleanolat dengan konsentrasi 100 dan 50  $\mu$ g/mL.

- e. Pembuatan larutan sampel

Larutan sampel dengan konsentrasi 1000  $\mu$ g/mL dibuat dengan melarutkan 10 mg dalam 10 mL DMSO. Kemudian larutan uji dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Volume labu ukur dicukupkan dengan larutan DMSO hingga diperoleh konsentrasi 200  $\mu$ g/mL. Selanjutnya di buat larutan uji dengan konsentrasi 100 dan 50  $\mu$ g/mL.

### 3.4.11 Uji Pendahuluan

- a. Optimasi substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin

DMSO sebanyak 50  $\mu$ L ditambahkan 60  $\mu$ L dapar Tris-HCl pH 8 dan 20  $\mu$ L larutan substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin dengan konsentrasi 8,8; 4,4; 2,2; 1,1 dan 0,55 mM. Larutan uji ditambahkan 20  $\mu$ L larutan enzim 0,08

U/mL lalu diinkubasi dengan shaker selama 15 menit pada suhu 25°C diukur absorbansinya menggunakan *96-well Microplate Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 50 µL asam asetat 25%. Pada uji larutan kontrol penambahan asam asetat 25% dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

**Tabel 3.2.** Prosedur optimasi konsentrasi substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin

Reagen	Volume (µL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	50	50
Dapar Tris-HCl 100 mM pH 8	60	60
Substrat N-suksinil-ala-ala-ala- <i>p</i> -nitroanilin (8,8; 4,4; 2,2; 1,1 dan 0,55 mM)	20	20
Enzim (0,08 U/mL)	20	-
Asam Asetat 25%	-	50
<b>Inkubasi 25°C, 15 menit</b>		
Enzim (0,08 U/mL)	-	20
Asam Asetat 25%	50	-
<b>Ukur absorbansi pada 405 nm</b>		

b. Optimasi waktu inkubasi

DMSO sebanyak 50 µL ditambahkan 60 µL dapar Tris HCl pH 8 dan 20 µL larutan substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin dengan konsentrasi 4,4 mM. Larutan uji ditambahkan 20 µL larutan enzim 0,08 U/mL lalu diinkubasi menggunakan shaker kecepatan 100 rpm dengan variasi waktu inkubasi selama 10, 15 dan 20 menit pada suhu 25°C. Kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan *96-well Microplate Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 50 µL asam asetat 25%. Pada uji larutan kontrol penambahan asam asetat 25% dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

**Tabel 3.3.** Prosedur waktu inkubasi

Reagen	Volume (µL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	50	50
Dapar Tris-HCl 100 mM pH 8	60	70
Substrat N-suksinil-ala-ala-ala- <i>p</i> -nitroanilin 4,4 mM	20	20
Enzim (0,08 U/mL)	20	-
Asam Asetat 25%	-	50
<b>Inkubasi 25°C, 10, 15 dan 20 menit</b>		
Enzim (0,08 U/mL)	-	20
Asam Asetat 25%	50	-
<b>Ukur absorbansi pada 405 nm</b>		

## 3.4.12 Perhitungan Aktivitas Enzim (Sigma)

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{(A_{405\text{NM}} \text{ Uji} - A_{405\text{NM}} \text{ Blanko}) \times V \times df}{9,96 \times V_e \times t} \quad \dots\dots (3.1)$$

$$\text{Unit/mg enzim} = \text{Unit/mL enzim} \times \frac{1}{c} \quad \dots\dots (3.2)$$

**Keterangan :**

V = Volume total (µL)

df = faktor pengenceran

9,96 = Ekstingsi milimolar *p*-nitroanilin pada 405 nmV<sub>e</sub> = Volume enzim (µL)

t = Waktu inkubasi

c = Banyaknya elastase dalam larutan (mg/mL)

**Definisi Unit:** (Sigma)

Satu unit akan melepaskan 1,0 µmol N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin per menit pada pH 8 dan suhu 25 °C.

## 3.4.13 Penentuan Penghambatan Aktivitas Elastase

Uji penghambatan aktivitas elastase dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh.

**Tabel 3.4.** Prosedur uji penghambatan aktivitas elastase

Reagen	Volume (µL)			
	B1	B0	S1	S0
Kontrol Positif/Sampel	-	-	50	50
DMSO	50	50	-	-
Dapar Tris-HCl	60	60	60	60
Substrat N-suksinil-ala-ala-ala- <i>p</i> -nitroanilin 4,4 mM	20	20	20	20
Enzim (0,08 U/mL)	20	-	20	-
Asam asetat 25%	-	50	-	50
<b>Inkubasi 15 menit pada suhu 25°C</b>				
Enzim (0,08 U/mL)	-	20	-	20
Asam asetat 25%	50	-	50	-
<b>Ukur Absorbansi Pada 405 nm</b>				

Keterangan: B1= Blanko, B0= Kontrol Blanko, S1= Sampel dan Standar (asam oleanolat), S0= Kontrol Sampel dan Kontrol Standar (asam oleanolat)

Aktivitas inhibitor elastase dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(C - S)}{C} \times 100\% \quad \dots\dots (3.3)$$

Keterangan: S = absorbansi Sampel (S1-S0)

C = absorbansi Blanko (B1-B0)

### 3.4.14 Identifikasi Fitokimia

#### 3.4.14.1 Identifikasi alkaloid (Wagner & Bladt, 1996; Farnsworth, 1966)

Ekstrak etanol aseton, fraksi kloroform dan fraksi A, B, dan C sebanyak 15 mg ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan. Kemudian disaring dan ditampung filtratnya. Filtrat tersebut digunakan sebagai larutan uji. Dilakukan pula pengujian pada Chinae Korteks sebagai kontrol positif.

- a. Sebanyak 1 mL filtrat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Bouchardat, terbentuk endapan coklat / hitam (positif alkaloid).

- b. Sebanyak 1 mL filtrat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (positif alkaloid).
- c. Sebanyak 1 mL filtrat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorff, terbentuk endapan jingga coklat (positif alkaloid).

#### 3.4.14.2 Identifikasi flavonoid (Wagner & Bladt, 1996)

Larutan ekstrak aseton, fraksi kloroform, dan fraksi A, B, dan C 2  $\mu$ L ditotolkan pada lempeng silika gel lalu dielusi dengan n-heksana : etil asetat (8:2). Deteksi adanya flavonoid dengan menggunakan penampak bercak  $AlCl_3$  0,5%. Flavonoid akan berfluoresensi kuning pada UV 365 nm. Dilakukan pula pengujian pada *Orthosiphonis Folium* sebagai kontrol positif.

#### 3.4.14.3 Identifikasi sterol/terpen (Wagner & Bladt, 1996)

Larutan ekstrak aseton, fraksi kloroform, dan fraksi A, B, dan C 2  $\mu$ L ditotolkan pada lempeng silika gel lalu dielusi dengan n-heksana : etil asetat (8:2). Deteksi adanya terpen dengan menggunakan penampak bercak vanillin-asam sulfat. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak warna biru-ungu. Dilakukan pula pengujian pada *Caryophylli Flos* sebagai kontrol positif.

#### 3.4.14.4 Identifikasi tanin (Farnsworth, 1966)

Identifikasi tanin dilakukan dengan menimbang 15 mg ekstrak aseton, fraksi kloroform, dan fraksi A, B, dan C masing-masing sebanyak 13 mg ditambahkan 15 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring. Filtrat sebanyak 1 mL ditambahkan 3 mL gelatin 10% membentuk endapan putih (positif tanin). Dilakukan pula pengujian pada *Theae Folium* sebagai kontrol positif.

#### 3.4.14.5 Identifikasi saponin (Depkes, 1995b)

Ekstrak ekstrak aseton, fraksi kloroform, dan fraksi A, B, dan C masing-masing sebanyak 15 mg ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian

dikocok kuat-kuat selama 10 detik, lalu didiamkan selama 10 menit. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang. Dilakukan pula pengujian pada *Liquiritiae Radix* sebagai kontrol positif.

#### 3.4.15 Penentuan Kinetika Penghambatan Aktivitas Elastase

Penentuan kinetika penghambatan enzim dilakukan pada fraksi yang memiliki persen inhibisi terbesar. Penentuan kinetika penghambatan enzim diukur dengan empat konsentrasi substrat yang berbeda yaitu 4,4; 2,2; 1,1 dan 0,55 mM. Jenis penghambatan ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk plot untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Dewi et al., 2007). Tetapan kinetika Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ , dimana  $x$  adalah jumlah substrat  $1/[S]$  dan  $y$  adalah  $1/A$ .

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \dots\dots\dots (3.4)$$

$$y = 0 \rightarrow x = - 1/K_M$$

$$y = a + b (- 1/K_M) \rightarrow K_M = b/a \quad \dots\dots\dots (3.5)$$

**Tabel 3.5.** Prosedur penentuan kinetika penghambatan elastase

Reagen	Volume ( $\mu$ L)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	50
DMSO	50	-
Dapar Tris-HCl 100 mM pH 8	60	60
Substrat N-suksinil-ala-ala-ala- <i>p</i> -nitroanilin (4,4; 2,2; 1,1 dan 0,55 mM)	20	20
Enzim (0,08 U/mL)	20	20
<b>Inkubasi 25°C, 15 menit</b>		
Asam Asetat 25%	50	50
<b>Ukur absorbansi pada 405 nm</b>		

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Struktur Protein Target

Sebelum melakukan penambatan, makromolekul yang digunakan sebagai target perlu dicari dan diproses terlebih dahulu. Dalam penelitian ini, digunakan makromolekul target dari *pancreatic elastase* yaitu *porcine pancreatic elastase*.

##### 4.1.1 Pencarian dan Pengunduhan Struktur Protein

Hal pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan pencarian makromolekul yang sesuai dengan laman bank data protein (PDB). Struktur molekul yang dicari adalah makromolekul yang tidak berikatan dengan ligan. Hal tersebut dikarenakan belum adanya struktur makromolekul yang berikatan dengan ligan yang berperan sebagai anti aging sehingga berdasarkan pencarian diperoleh struktur makromolekul dengan identitas PDB 1QNJ. Pemilihan makromolekul 1QNJ disebabkan struktur *porcine pancreatic elastase* memiliki sekuen yang lengkap serta resolusi sebesar 1,1 Å sehingga memungkinkan penentuan posisi atom dengan resolusi yang tinggi.

##### 4.1.2 Optimasi Struktur Protein

Struktur 1QNJ yang telah diunduh dari bank data protein masih terdapat residu pelarut (air) dan residu non-standar lainnya seperti ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{SO}_4^{2-}$ . Residu ini dapat mengganggu proses penapisan dan penambatan sehingga perlu dipisahkan dari struktur makromolekul. Pemisahan residu non-standar ini dilakukan menggunakan UCSF Chimera.

Setelah semua residu dihilangkan, dilakukan penambahan hidrogen ke dalam struktur kristal. Atom-atom hidrogen umumnya tidak terdeteksi dalam pendefinisian struktur kristal sehingga perlu ditambahkan karena mempengaruhi proses ikatan hidrogen dengan ligan yang akan ditambatkan. Kemudian dilakukan perbaikan muatan menggunakan medan gaya AutoDock serta penambahan muatan Gasteiger yang umum dipakai untuk penggunaan AutoDock. Kemudian dilakukan minimisasi energi untuk menemukan konformasi geometris dengan

energi optimum terkecil sehingga struktur dapat dinyatakan stabil untuk target penambatan. Penambahan hidrogen, perbaikan muatan dan minimisasi energi dilakukan menggunakan VegaZZ. Minimisasi dilakukan dengan metode *steepest descent* dan *conjugate gradient* sebanyak 1000 langkah. Kedua metode ini merupakan algoritma yang umum untuk minimisasi fungsi kuadratik. Minimisasi dilakukan dengan kedua metode yang merupakan standar minimisasi protein menggunakan VegaZZ agar struktur tidak *collapsing* namun tetap menyediakan konformasi yang relaks (Perola, Walters & Charifson, 2005).

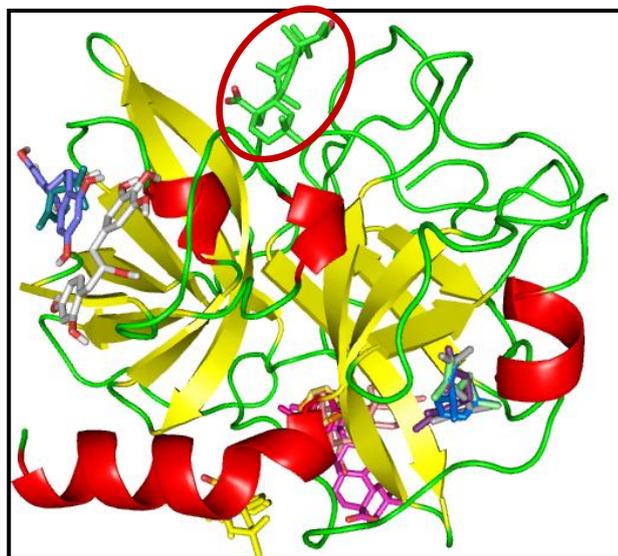
#### 4.2 Mendefinisikan Situs Ikatan dengan Metode Penambatan Buta

Untuk mendefinisikan situs ikatan dengan metode penambatan buta digunakan kontrol positif didapat dari struktur kristal data bank protein. Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa sitral, sitronelal, timol, geraniol yang telah uji secara *in silico* sebagai inhibitor elastase (Sivamani, Singaravelu, Thiagarajan, Jayalakshmi & Kumar, 2012). Selain itu, senyawa epigalokatekin digunakan sebagai kontrol positif secara *in vitro* pada penghambatan elastase (Thring, Hili & Naughton, 2009) dan senyawa asam oleanolat sebagai kontrol positif secara *in vitro* pada penghambatan elastase (Kim, Byun, Bandi, Hyun & Lee, 2009).

Struktur senyawa dijelajah dari situs web Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.gov>). Senyawa kontrol diunduh dalam format teks.sdf lalu di konversi dengan Open Babel menjadi teks.pdb. Kemudian struktur tiga dimensi dioptimasi menggunakan VegaZZ untuk pemberian muatan dan minimisasi energi. Penambahan hidrogen dilakukan karena fungsi penilaian piranti lunak yang digunakan membutuhkan hidrogen polar dan nonpolar dalam perhitungannya. Muatan dan medan gaya yang digunakan sama seperti makromolekul yakni muatan parsial gasteiger dan medan gaya AutoDock yang umum digunakan sebagai *default* penambatan menggunakan AutoDock. Selanjutnya struktur tiga dimensi disimpan dalam format pdbqt.

Untuk mengetahui situs ikatan dilakukan metode penambatan buta (*blind docking*) dengan gridbox berukuran 126 x 126 x 126 unit (*spacing* 1 unit = 0,375 angstrom) sehingga mencakup seluruh protein dan diperoleh nilai koordinat x =

5,613;  $y = 2,996$ ;  $z = 6,269$ . Situs dengan energi paling rendah (asam oleanolat) dan konfigurasi yang hampir mirip dengan jurnal yang telah dilaporkan oleh Sivamani dkk., digunakan sebagai situs ikatan. Hasil visualisasi dari konfigurasi pada penambatan buta dapat dilihat pada Gambar 4.1.



(a)



(b)

Keterangan: posisi asam oleanolat yang memiliki nilai energi paling rendah (a); posisi sitral yang dilaporkan oleh Sivamani dkk. sebagai perbandingan dengan visualisasi penambatan buta

**Gambar 4.1.** Visualisasi PPE dengan ligan dari konfigurasi pada penambatan buta koordinat  $x = 5,613$ ;  $y = 2,996$ ;  $z = 6,269$  dengan gridbox berukuran  $126 \times 126 \times 126$  unit (a); visualisasi PPE dengan senyawa sitral (b)

**Tabel 4.1.** Senyawa kontrol yang digunakan untuk penambatan buta

No.	Ligan	<i>Binding Energy</i>	<i>Run</i>	<i>Num in Cluster</i>	<b>Keterangan</b>
1.	Asam oleanolat	-8,51	57	4	<i>Best Binding Energy</i>
2.	Asam oleanolat	-8,02	63	23	<i>Best Cluster</i>
3.	Epigalokatekin	-7,20	9	5	<i>Best Binding Energy</i>
4.	Epigalokatekin	-7,01	14	16	<i>Best Cluster</i>
5.	Timol	-6,55	43	20	<i>Best Binding Energy</i>
6.	Timol	-5,66	68	39	<i>Best Cluster</i>
7.	Sitronelal	-5,56	83	19	<i>Best Binding Energy &amp; Best Cluster</i>
8.	Geraniol	-5,36	27	12	<i>Best Binding Energy</i>
9.	Geraniol	-4,30	33	31	<i>Best Cluster</i>
10.	Sitral	-5,26	81	13	<i>Best Binding Energy</i>
11.	Sitral	-4,36	89	42	<i>Best Cluster</i>

Setelah diketahui situs dengan energi paling rendah, dilakukan penambatan molekuler bertarget untuk memastikan situs ikatan dengan menggunakan senyawa asam oleanolat pada run ke-57 dan situs katalitik dari *porcine pancreatic elastase* yaitu His 57, Asp 102 dan Ser 195.

Penambatan bertarget dilakukan sebanyak tiga kali. Ketiga penambatan bertarget dilakukan triplo. Penambatan bertarget pertama digunakan *gridbox* berukuran 70 x 70 x 70 unit (*spacing* 1 unit = 0,375 angstrom) dan diperoleh nilai koordinat x = 8,2; y = 4,809; z = -2,132.

**Tabel 4.2.** Penambatan bertarget pertama

No.	Nama	$\Delta G$ (kkal/mol)			Rata-Rata	SD
		1	2	3		
1	Asam oleanolat	-7,74	-8,02	-7,95	-7,90	0,146
2	Epigalokatekin	-7,43	-7,36	-7,38	-7,39	0,036
3	Timol	-4,75	-4,81	-4,82	-4,79	0,038

4	Sitral	-4,19	-4,00	-4,03	-4,07	0,102
5	Sitronelal	-4,05	-4,00	-4,06	-4,04	0,032
6	Geraniol	-4,02	-3,79	-4,03	-3,95	0,136

Penambatan bertarget kedua digunakan *gridbox* berukuran 80 x 80 x 80 unit (*spacing* 1 unit = 0,375 angstrom) dan diperoleh nilai koordinat x = 6,028; y = 5,425; z = -0,885.

**Tabel 4.3.** Penambatan bertarget kedua

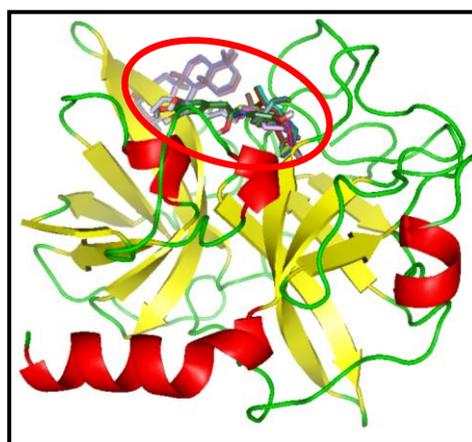
No.	Nama	$\Delta G$ (kkal/mol)			Rata-Rata	SD
		1	2	3		
1	Asam oleanolat	-7,74	-7,92	-8,09	-7,92	0,175
2	Epigalokatekin	-7,43	-7,43	-7,39	-7,42	0,023
3	Timol	-4,75	-4,87	-4,81	-4,81	0,060
4	Sitral	-4,19	-4,17	-3,95	-4,10	0,133
5	Sitronelal	-4,05	-3,95	-3,98	-3,99	0,051
6	Geraniol	-4,02	-3,87	-3,99	-3,96	0,079

Penambatan bertarget ketiga digunakan *gridbox* berukuran 60 x 60 x 60 unit (*spacing* 1 unit = 0,375 angstrom) dan diperoleh nilai koordinat x = 6,843; y = 4,344; z = -8,116.

**Tabel 4.4.** Penambatan bertarget ketiga

No.	Nama	$\Delta G$ (kkal/mol)			Rata-Rata	SD
		1	2	3		
1	Asam oleanolat	-7,64	-7,63	-7,63	-7,63	0,006
2	Epigalokatekin	-7,34	-7,36	-7,20	-7,30	0,087
3	Timol	-4,81	-4,75	-4,81	-4,79	0,035
4	Sitral	-3,96	-4,13	-3,96	-4,02	0,098
5	Sitronelal	-3,89	-3,81	-4,08	-3,93	0,139
6	Geraniol	-4,10	-3,89	-3,62	-3,87	0,241

Dari ketiga penambatan bertarget yang dilakukan terlihat bahwa penambatan bertarget kedua memiliki nilai energi yang terendah jika dibandingkan dengan penambatan bertarget pertama dan ketiga. Selain itu, gridbox pada penambatan bertarget kedua lebih besar sehingga memungkinkan senyawa-senyawa dengan ukuran molekul lebih besar yang akan dilakukan pada penapisan virtual dapat tertutup. Oleh karena itu, situs yang digunakan untuk penapisan virtual menggunakan parameter koordinat  $x = 6,028$ ;  $y = 5,425$ ;  $z = -0,885$  dengan gridbox berukuran  $80 \times 80 \times 80$  unit (*spacing* 1 unit = 0,375 angstrom). Hasil visualisasi dari konfigurasi pada penambatan bertarget kedua dapat dilihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2.** Visualisasi PPE dengan ligan pada targeting docking kedua dengan gridbox berukuran  $80 \times 80 \times 80$  unit dan nilai kordinat  $x = 6,028$ ;  $y = 5,425$ ;  $z = -0,885$

### 4.3 Penapisan Virtual

Penapisan virtual menggunakan AutoDock memerlukan bantuan dari PyRx untuk mengolah berkas ligan menjadi .pdbqt dan melakukan penambatan berseri untuk penapisan virtual. Kotak grid yang digunakan berdimensi  $80 \times 80 \times 80$  dengan tiap unit setara dengan 0,375 angstrom. AutoDock dijalankan dengan parameter jumlah generasi algoritma adalah 27.000, kalkulasi sebesar 250.000 kali, populasi 150. Pelaksanaan *running* GA sebanyak 10 kali untuk tiap senyawa. Berkas yang dihasilkan AutoDock berada dalam berkas .dlg yang dapat dilihat menggunakan pemroses dokumen seperti wordpad ataupun alat bantu molekular seperti VegaZZ.

Pada penelitian ini dilakukan penapisan virtual terhadap 1406 senyawa dari basis data tanaman obat Indonesia. Jumlah senyawa yang masih sedikit yang terdapat dalam basis data senyawa tanaman obat di Indonesia menjadi kekurangan dalam penelitian ini. Hal ini disebabkan belum semua senyawa dalam tanaman obat di Indonesia dilaporkan. Namun, penapisan virtual terhadap 1406 senyawa tersebut mampu mengurangi pengujian aktivitas senyawa secara langsung sehingga dapat menekan biaya penelitian.

#### 4.4 Analisis Hasil Penapisan Virtual

Hasil penapisan virtual diperingkatkan berdasarkan nilai  $\Delta G$  yang terendah dari 10 besar. Setiap senyawa yang masuk 10 peringkat besar ditelusuri dari pustaka untuk aktivitas anti elastase bila ada.

**Tabel 4.5.** Hasil penapisan virtual menggunakan AutoDock

Nama Senyawa	<i>Binding Energy</i>			Rata-Rata	SD
	I	II	III		
Leucadenon B	-9,40	-9,29	-9,40	-9,36	0,064
Leucadenon A	-9,46	-9,22	-9,21	-9,30	0,142
Casiamin C	-9,25	-8,70	-8,38	-8,78	0,440
Leucadenon C	-8,85	-8,05	-9,39	-8,76	0,674
Leucadenon D	-8,02	-8,62	-8,10	-8,25	0,326
Witanolida	-7,62	-7,78	-8,27	-7,89	0,339
cis-Miyabenol C	-8,06	-7,94	-7,66	-7,89	0,205
Plukcosida A	-7,65	-8,22	-7,35	-7,74	0,442
Witangulatin A	-7,54	-7,64	-7,94	-7,71	0,208
Isoarborinol	-7,64	-7,72	-7,72	-7,69	0,046

Berdasarkan hasil penapisan virtual menggunakan AutoDock, senyawa yang menempati peringkat tertinggi adalah leucadenon B dengan  $\Delta G$  sebesar -9,36 kkal/mol. Senyawa leucadenon A, leucadenon C, leucadenon D yang menempati peringkat kedua, keempat dan kelima merupakan senyawa  $\beta$ -triketon flavanon yang mengalami tautomerisasi. Keempat senyawa tersebut terdapat pada tanaman daun *Melaleuca leucadendron* (kayu putih).

Thring, Hili, dan Naughton (2009) telah meneliti flavonoid dari daun kesemek (*Diospyros kaki*) memiliki aktivitas terhadap anti elastase. Penelitian ini menyimpulkan bahwa keempat senyawa yang merupakan golongan flavonoid tersebut diduga aktif sebagai anti elastase. Namun, penelitian secara *in vitro* terhadap aktivitas anti elastase dari daun *M. leucadendron* belum pernah dilakukan. Selain itu, daun *M. leucadendron* mudah diperoleh sehingga dipilih untuk penelitian secara *in vitro* terhadap aktivitas penghambatan elastase.

Senyawa peringkat kedua, yaitu casiamin C merupakan senyawa turunan antrakuinon dimerik (antron) yang terkandung dalam kulit akar tumbuhan *Cassia siamea* (johar) famili Fabaceae. Dari penelusuran pustaka belum ada penelitian tentang aktivitas anti elastase tumbuhan *Cassia siamea* (johar) ataupun casiamin C.

Senyawa peringkat 6, yaitu witanolida merupakan golongan senyawa steroid yang terdapat pada herba *Physalis angulata*. Ekstrak kasar dari *Physalis angulata* memiliki aktivitas anti inflamasi (Sun et al., 2011). Pada umumnya, tanaman yang memiliki aktifitas anti inflamasi diduga dapat berperan sebagai anti elastase. Hal tersebut dikarenakan, proses inflamasi akan menyebabkan terjadinya degradasi elastin oleh elastase. Namun, uji aktivitas anti elastase dari *Physalis angulata* maupun witanolida belum pernah dilakukan.

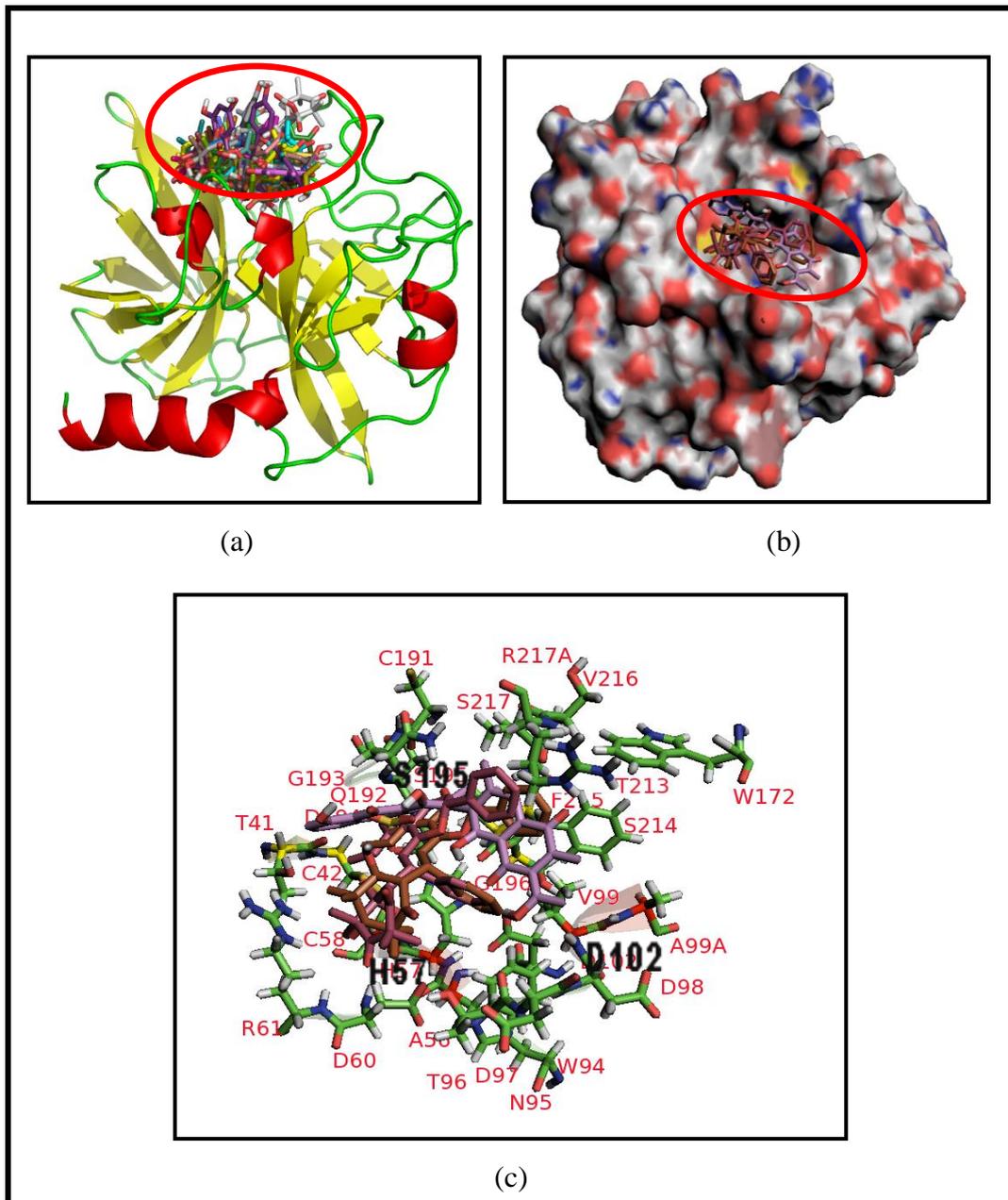
Senyawa peringkat 7, yaitu cis-miyabenol C merupakan glikosida fenol yang terdapat pada buah *Foeniculum vulgare*. Ekstrak metanol buah *Foeniculum vulgare* memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Ono et al., 1997). Adanya aktivitas antioksidan dapat mengikat radikal bebas yang merupakan pemicu aktivitas elastase akibat paparan sinar matahari. Sehingga pada penelitian ini menyimpulkan bahwa cis-miyabenol C yang berperan sebagai antioksidan diduga dapat berperan sebagai anti elastase.

Plukcosida A menempati peringkat 8 dan terdapat pada akar *Pluchea indica* (beluntas). Plukcosida A merupakan monoterpen glikosida. Akar *Pluchea indica* memiliki aktivitas anti inflamasi dan antioksidan (Sharma & Goyal, 2011). Namun, uji aktivitas anti elastase dari *Pluchea indica* maupun plukcosida A belum pernah dilakukan.

Senyawa peringkat 9, yaitu witangulatin A yang merupakan golongan steroid terdapat pada herba *Physalis angulata*. Witangulatin A memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi (Sun et al., 2011). Senyawa peringkat 10, yaitu isoarborinol yang merupakan golongan triterpen yang terdapat pada rhizoma *Imperata cylindrica*. Senyawa witangulatin A dan isoarborinol belum pernah dilakukan uji aktivitas anti elastase.

#### **4.5 Visualisasi Hasil Penapisan Virtual**

Setelah dilakukan penapisan virtual, dilakukan visualisasi menggunakan PyMOL pada sepuluh peringkat teratas. Pada visualisasi dapat dilihat ikatan antara makromolekul dan senyawa. Selain itu, pada visualisasi dapat dilihat tiga residu asam amino yakni His57, Asp102 dan Ser195. Tiga residu asam amino tersebut merupakan tiga serangkai katalitik PPE yang merupakan tempat ikatan senyawa. Visualisasi 10 senyawa dengan peringkat teratas dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Keterangan: visualisasi PPE (merah:  $\alpha$  helix; kuning  $\beta$  sheet; hijau loop) beserta sepuluh senyawa yang dilingkahi merah (a); visualisasi PPE beserta tiga senyawa peringat teratas yang dilingkahi merah (b); visualisasi tiga senyawa peringat teratas dengan tiga sisi katalitik PPE (tulisan hitam) yaitu H57, S195, dan D102 (c)

**Gambar 4.3.** Visualisasi 10 senyawa dengan peringat teratas (a); visualisasi 3 senyawa dengan peringat teratas dalam bentuk *molecular surface* (b); visualisasi 3 senyawa dengan peringat teratas beserta residu asam amino (c)

#### 4.6 Penyiapan Bahan Uji

Daun *M. leucadendron* dipilih karena mengandung senyawa leucadenon A-D yang menempati peringat 5 besar dari hasil penapisan virtual. Selain itu,

senyawa leucadenon A-D merupakan senyawa golongan flavonoid yang terdapat dalam daun *M. leucadendron* (Lee, 1999). Terpenoid, flavonoid, senyawa fenolik telah terbukti memiliki aktivitas anti elastase (Onar et al., 2012). Daun *M. leucadendron* juga mengandung beberapa senyawa terpenoid (Lee & Chang, 1999). Hal lain yang menjadi pertimbangan adalah mudahnya memperoleh daun *M. leucadendron* karena tanaman ini tumbuh disepanjang musim di Indonesia.

Daun yang digunakan terlebih dahulu dicuci yang bertujuan untuk membersihkan dari debu dan tanah. Selanjutnya, dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan untuk mengurangi kadar air dalam simplisia. Simplisia dimaserasi untuk mencegah kerusakan kandungan kimia yang tidak tahan terhadap pemanasan.

#### 4.7 Ekstraksi

Daun *Melaleuca leucadendron* dilakukan maserasi dengan pelarut aseton. Hal tersebut merupakan tahap awal untuk mengekstraksi senyawa leucadenon A-D (Lee, 2009). Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya, ekstrak kental ditimbang untuk menghitung persen rendemen kemudian disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C untuk mencegah tumbuhnya mikroba yang tidak diinginkan (Depkes RI, 2000). Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.6.

**Tabel 4.6.** Rendemen hasil ekstrak aseton

<b>Simplisia</b>	<b>Bobot Daun (g)</b>	<b>Bobot Ekstrak Aseton (g)</b>	<b>Rendemen Ekstrak Aseton (%)</b>
Daun <i>Melaleuca leucadendron</i>	2000	533	26,65

#### 4.8 Fraksinasi

Tahap selanjutnya setelah maserasi yaitu fraksinasi ekstrak kental aseton dengan pelarut kloroform (Lee, 1999). Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan

senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak aseton berdasarkan perbedaan kepolaran pelarut. Ekstrak kental aseton didispersikan dengan air panas terlebih dahulu, kemudian ditambahkan kloroform. Dua lapisan terbentuk dengan lapisan air yang berada di bagian atas dan lapisan kloroform di bagian bawah. Hal tersebut karena kloroform memiliki massa jenis yang lebih besar jika dibandingkan air sehingga kloroform berada di lapisan bawah. Lapisan kloroform dipisahkan, kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh fraksi kloroform kental. Fraksi kloroform kental yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C. Nilai rendemen fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.7.

**Tabel 4.7.** Rendemen hasil fraksi kloroform

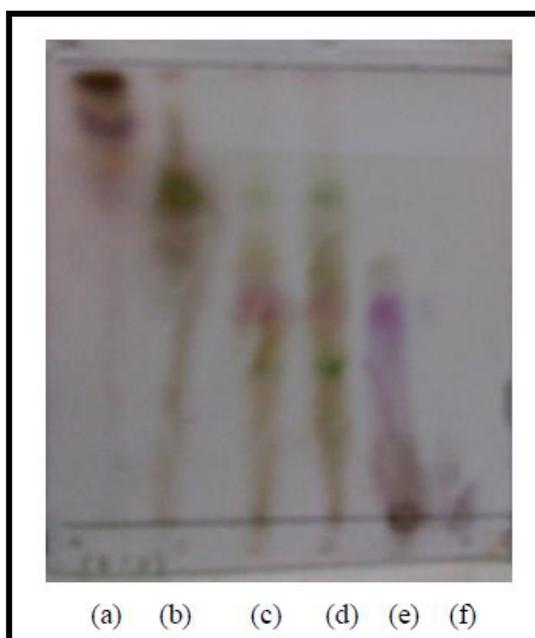
<b>Simplisia</b>	<b>Bobot Ekstrak</b>	<b>Bobot Fraksi</b>	<b>Rendemen Fraksi</b>
	<b>Aseton (g)</b>	<b>Kloroform (g)</b>	<b>Kloroform (%)</b>
Daun <i>Melaleuca leucadendron</i>	150	123,2	82,13

#### 4.9 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Sebanyak 25 gram fraksi kloroform dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom vakum dengan perbandingan gradien pelarut n-heksana dan etil asetat. Hal ini dilakukan untuk memisahkan senyawa leucadenon A-D yang berdasarkan literatur dilakukan kromatografi kolom dengan gradien pelarut n-heksana dan etil asetat (Lee, 1999). Hasil pemisahan diperoleh 22 fraksi kemudian fraksi digabungkan berdasarkan pola warna pada kromatogram dan nilai R<sub>f</sub>. Berdasarkan pola kromatogram KLT diperoleh 6 fraksi gabungan, yakni A, B, C, D, E dan F. Nilai R<sub>f</sub> dan rendemen fraksi gabungan kolom dapat dilihat pada Tabel 4.9. Sementara pola kromatogram fraksi gabungan dapat dilihat pada Gambar 4.4.

**Tabel 4.8.** Nilai Rf dan rendemen hasil fraksi kolom gabungan terhadap fraksi kloroform 25 g

Fraksi	Nilai Rf	Massa Fraksi (g)	Rendemen (%)
A	0,86	0,649	2,596
B	0,79	1,052	4,208
C	0,58	0,681	2,724
D	0,74	1,393	5,572
E	0,55	0,731	2,924
F	0,28	0,503	2,012



Keterangan: hasil pola kromatogram fraksi A-F disemprot asam sulfat 10% dalam metanol dan plat KLT dipanaskan dengan suhu 100-110°C

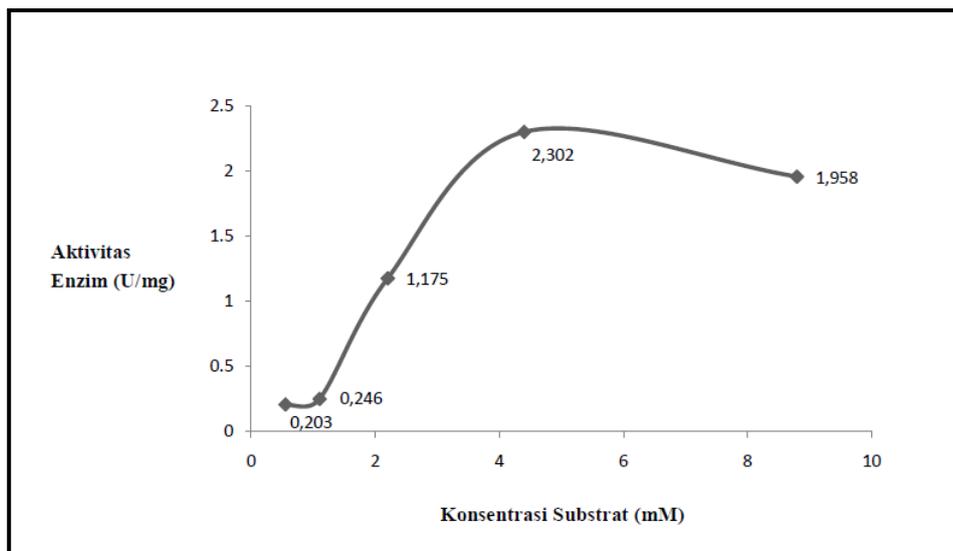
**Gambar 4.4.** Pola kromatogram fraksi gabungan

#### 4.10 Uji Pendahuluan Aktivitas Elastase

Pada tahap pendahuluan dilakukan penetapan konsentrasi optimum substrat dan penetapan waktu inkubasi yang sesuai dengan kondisi analisis yang digunakan sehingga enzim dapat bekerja secara optimal.

#### 4.10.1 Optimasi Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Elastase

Optimasi konsentrasi substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin terhadap aktivitas elastase untuk memperoleh konsentrasi substrat yang optimum. Larutan enzim dibuat dengan konsentrasi sebesar 0,08 U/mL. Substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin, dapar Tris-HCl (pH 8,0) dan larutan enzim elastase 0,08 U/mL diinkubasi selama 15 menit pada suhu 25 °C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan asam asetat 25%. Asam asetat 25% dipilih sebagai penghenti reaksi sebab mampu menurunkan pH larutan uji menjadi asam sehingga enzim akan terdenaturasi. Produk yang dihasilkan dari reaksi enzimatis ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah ditetapkan yaitu 405 nm. Pengujian kontrol blanko untuk mengoreksi apakah masih ada produk yang terbentuk pada reaksi antara N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin dan elastase saat kondisi campuran telah diasamkan terlebih dahulu dengan asam asetat 25%. Oleh karena itu, pengamatan dilakukan dengan menukar posisi antara elastase dan asam asetat 25%. Pada kontrol, asam asetat 25% ditambahkan pada campuran substrat N-suksinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilin dan dapar Tris-HCl (pH 8,0). Setelah diinkubasi selama 15 menit, ditambahkan elastase pada campuran reaksi tersebut. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,55; 1,1; 2,2; 4,4; dan 8,8 mM (Lampiran 3). Jika konsentrasi substrat ditingkatkan, sementara semua kondisi lain dipertahankan tetap konstan, kecepatan awal yang terukur akan meningkat mencapai nilai maksimum hingga tercapai suatu keadaan yang sudah dapat dikatakan enzim jenuh oleh substrat (Murray et al., 2009). Hasil yang diperoleh menunjukkan terdapat kenaikan absorbansi dari konsentrasi substrat 0,55 hingga 4,4 mM, dan terjadi penurunan absorbansi pada konsentrasi substrat 8,8 mM (Gambar 4.5) sehingga ditafsirkan enzim telah jenuh oleh substrat pada konsentrasi substrat 4,4 mM. Dengan demikian, untuk uji aktivitas penghambatan enzim elastase 0,08 U/ml dapat digunakan konsentrasi substrat 4,4 mM.

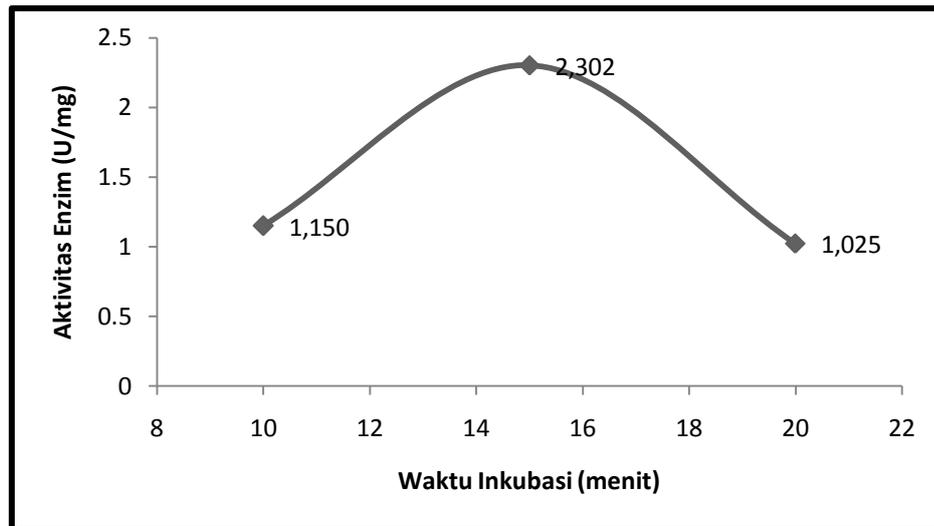


**Gambar 4.5.** Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat N-suksinil-ala-ala-*p*-nitroanilin 0,55 hingga 8,8 mM

#### 4.10.2 Optimasi Aktivitas Elastase dengan Variasi Waktu Inkubasi

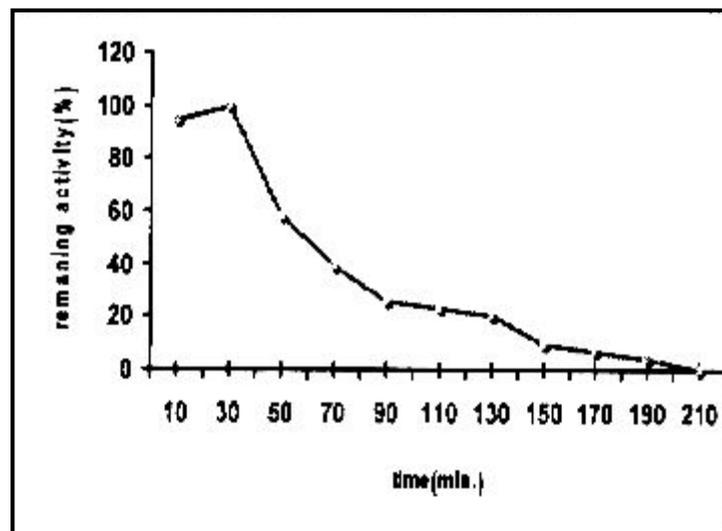
Optimasi aktivitas enzimatis terhadap variasi waktu inkubasi dilakukan untuk mengetahui waktu optimum bagi kerja elastase. Hal tersebut dikarenakan tidak adanya standar waktu inkubasi pada protokol kerja enzim pada produk Sigma (E0258). Selain itu, adanya perbedaan waktu inkubasi pada penelitian yang telah ada sehingga perlu dilakukan optimasi terhadap waktu inkubasi. Pemilihan suhu awal 15 menit didasarkan pada penelitian oleh Kim, Byun, Bandi, Hyun dan Lee pada tahun 2009.

Hasil dari optimasi waktu inkubasi didapatkan aktivitas enzim terbesar pada waktu inkubasi 15 menit dan terjadi penurunan aktivitas pada waktu inkubasi 20 menit (lihat pada Lampiran 4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu inkubasi 15 menit merupakan waktu optimum kerja elastase terhadap substrat N-suksinil-ala-ala-*p*-nitroanilin dan hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kim, Byun, Bandi, Hyun dan Lee pada tahun 2009.



**Gambar 4.6.** Kurva optimasi aktivitas elastase dengan variasi waktu inkubasi 10, 15 dan 20 menit

Dengan bertambahnya waktu inkubasi, aktivitas enzim akan mengalami penurunan aktivitas saat titik optimum sudah terlewati. Hal tersebut diduga dikarenakan terbentuknya inhibitor yang mempengaruhi pengikatan substrat dengan enzim. Sebagai perbandingan grafik, enzim laccase pada waktu inkubasi 30 menit mencapai titik optimum dan mengalami penurunan aktivitas yang signifikan pada menit ke-50 (Gambar 4.7.) (Alias, Hashim & Kareem, 2008).



[Sumber: Alias, Hashim & Kareem, 2008]

**Gambar 4.7.** Kurva optimasi aktivitas enzim laccase dengan variasi waktu inkubasi 10 sampai 210 menit

#### 4.11 Uji Aktivitas Penghambatan Elastase

Hasil penapisan uji *in silico* aktivitas penghambatan elastase dari basis data senyawa tanaman obat di Indonesia diperoleh senyawa leucadenon B sebagai peringkat tertinggi. Selain itu senyawa leucadenon A, C dan D berturut-turut menempati peringkat 2, 4 dan 5. Keempat senyawa tersebut terdapat dalam daun *M. leucadendron* L. sehingga berdasarkan penelitian tersebut dilakukan uji *in vitro* dari ekstrak dan fraksi daun *M. leucadendron* L yang secara literatur belum pernah dilakukan uji terhadap aktivitas penghambatan elastase.

Ekstrak dan fraksi daun *M. leucadendron* L. diuji pada konsentrasi 50, 25 dan 12,5 µg/mL. Variasi konsentrasi ini dibuat untuk melihat pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak dan fraksi terhadap aktivitas penghambatan elastase.

Dalam pengujian penghambatan aktivitas enzim, nilai absorbansi sampel (S) dibandingkan dengan blanko (B). Larutan sampel (S) adalah larutan ekstrak, fraksi, dan asam oleanolat yang merupakan inhibitor aktivitas elastase. Sedangkan, larutan blanko (B) adalah larutan uji tanpa sampel dengan perlakuan yang sama dengan larutan uji sampel. Pengujian larutan kontrol, baik kontrol sampel maupun kontrol blanko, dilakukan sebagai faktor koreksi. Kontrol sampel (S<sub>0</sub>) perlakuannya sama dengan kontrol blanko (B<sub>0</sub>) yaitu dengan menukar posisi penambahan enzim dan asam asetat, hanya saja dilakukan dengan penambahan sampel.

Data penghambatan aktivitas elastase oleh semua ekstrak dan fraksi *M. leucadendron* L. serta kontrol positif (asam oleanolat) dapat dilihat secara terperinci pada Lampiran 5 sampai dengan Lampiran 13. Persen inhibisi elastase berturut-turut pada konsentrasi 50; 25; dan 12,5 µg/mL, fraksi A adalah 68,3; 57,0; dan 47,6% dan fraksi B adalah 68,1; 64,0; dan 48,3%. Pada konsentrasi yang sama, nilai persen inhibisi fraksi A dan B lebih besar jika dibandingkan asam oleanolat yaitu 62,4; 55,9; dan 46,5%. Asam oleanolat merupakan senyawa golongan terpenoid yang digunakan sebagai bahan formula kosmetik anti kerut di Korea (Kim, Byun, Bandi, Hyun & Lee, 2009).

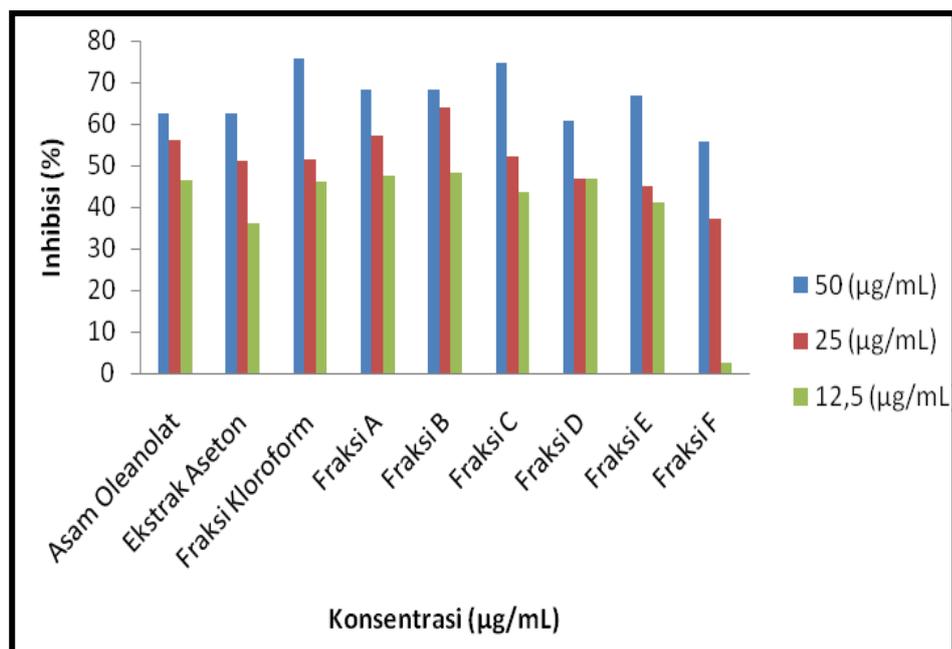
Pada konsentrasi 25 µg/mL fraksi A (57,0%) dan fraksi B (64,0%) memiliki nilai inhibisi penghambatan elastase > 55%. Pada konsentrasi 25 µg/mL

senyawa asam betulinat (53,0%), asam arjunolat (33,5%) dan katekin (50,2%) yang diisolasi dari batang *Callistemon lanceolatus* memiliki nilai inhibisi penghambatan elastase < 55% (Kim, Byun, Bandi, Hyun & Lee, 2009). Ekstrak daun *Epilobium angustifolium* pada konsentrasi 25 µg/mL memiliki nilai inhibisi penghambatan elastase sebesar 42,72% (Onar, Yusufoglu, Turker & Yanardag, 2012). Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi A dan fraksi B daun *Melaleuca leucadendron* pada konsentrasi 25 µg/mL memiliki aktifitas penghambatan elastase yang lebih baik jika dibandingkan asam betulinat, asam arjunolat, katekin dan ekstrak daun *Epilobium angustifolium*.

Dari hasil penapisan fitokimia, fraksi A dan fraksi B memiliki kandungan flavonoid dan terpenoid. Keberadaan flavonoid dan terpenoid dalam fraksi A dan fraksi B diduga memiliki efek sinergis terhadap penghambatan elastase sehingga pada konsentrasi 50, 25 dan 12,5 µg/mL diperoleh nilai persen inhibisi yang lebih besar jika dibandingkan dengan asam oleanolat yang merupakan senyawa terpenoid. Hal tersebut sesuai dengan literatur bahwa senyawa terpenoid dan flavonoid memiliki aktivitas anti elastase (Onar et al., 2012).

**Tabel 4.9.** Persen inhibisi asam oleanolat, ekstrak dan fraksi daun *Melaleuca leucadendron* pada konsentrasi 50, 25 dan 12,5 µg/mL

Sampel Uji	Inhibisi (%)		
	50 (µg/mL)	25 (µg/mL)	12,5 (µg/mL)
Asam Oleanolat	62,4	55,9	46,5
Ekstrak Aseton	62,4	51,1	36,2
Fraksi Kloroform	75,6	51,5	46,0
Fraksi A	68,3	57,0	47,6
Fraksi B	68,1	64,0	48,3
Fraksi C	74,5	52,3	43,6
Fraksi D	60,8	46,7	46,8
Fraksi E	66,7	45,1	40,9
Fraksi F	55,6	37,2	2,6



**Gambar 4.8.** Perbandingan persen inhibisi asam oleanolat, ekstrak dan fraksi daun *Melaleuca leucadendron*

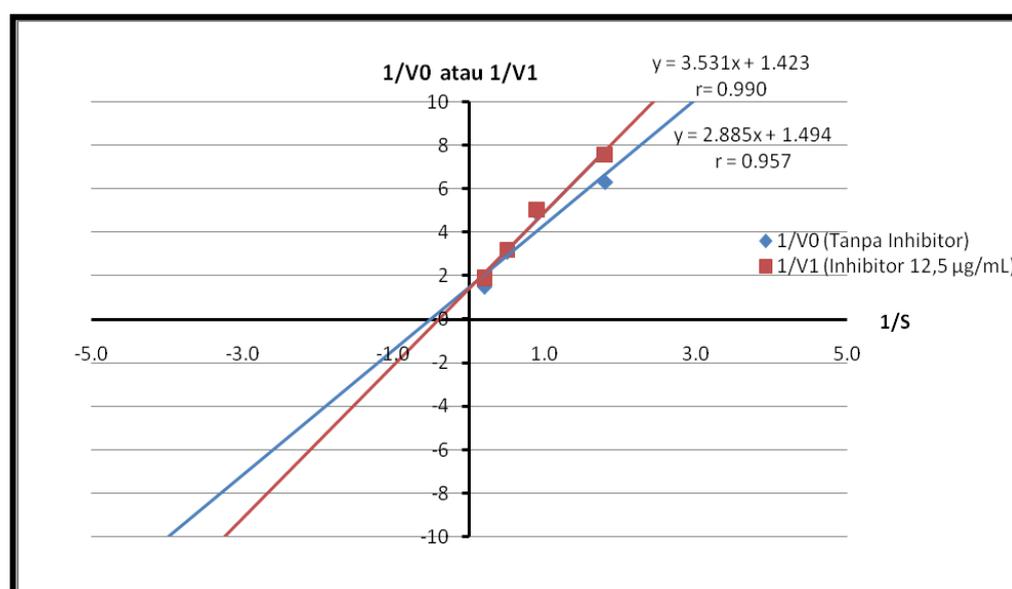
#### 4.12 Penentuan Kinetika Penghambatan Elastase

Kinetika enzim dilakukan untuk mengetahui jenis inhibisi sampel terhadap enzim. Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat digunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x adalah satu per konsentrasi substrat ( $1/S$ ) sedangkan sumbu y adalah satu per kecepatan reaksi enzim ( $1/V$ ). Kinetika enzim dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya terhadap kenaikan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 0,55; 1,1; 2,2; dan 4,4 mM.

Penghambat yang dipilih adalah fraksi B karena pada konsentrasi 12,5 µg/mL merupakan fraksi yang paling besar persen inhibisinya dibandingkan ekstrak atau fraksi uji yang lain. Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$  dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan  $y = 2.885x + 1.494$  dengan nilai  $V_{max}$  0,67 µmol/mL menit dan nilai  $K_m$  1,93 µmol/mL. Sedangkan pada sistem dengan inhibitor diperoleh persamaan  $y = 3.531x + 1.423$  dengan nilai  $V_{max}$  0,70 µmol/mL menit dan nilai  $K_m$  2,48 µmol/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa  $V_{max}$  pada sistem dengan inhibitor memiliki perbedaan yang kurang signifikan (0,03) jika dibandingkan dengan  $V_{max}$  dengan sistem tanpa inhibitor. Peningkatan nilai  $K_m$  pada sistem dengan

inhibitor jika dibandingkan nilai  $K_m$  pada sistem tanpa inhibitor, menandakan bahwa fraksi B menghambat enzim secara kompetitif. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Lampiran 15.

Hasil plot (Gambar 4.9) menunjukkan bahwa fraksi B daun *M. leucadendron* L. memiliki titik potong sumbu y. Grafik ini menunjukkan fraksi tersebut memiliki mekanisme penghambatan kompetitif terhadap elastase. Hasil uji kinetika ini sebanding dengan hasil *docking* bahwa inhibitor melakukan penghambatan secara selektif kompetitif saat berikatan dengan sisi aktif enzim. Pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas penghambatan elastase pada konsentrasi fraksi B dapat dilihat pada Lampiran 14.

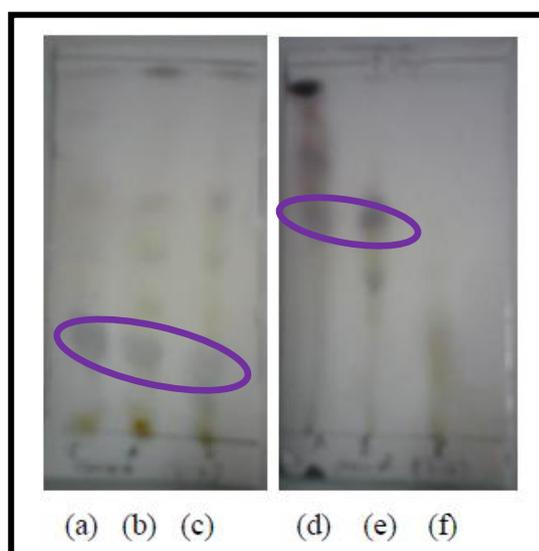


**Gambar 4.9.** Grafik kinetika inhibisi elastase pada fraksi B (12,5 µg/mL)

#### 4.13 Penapisan Fitokimia

Beberapa substansi kimia diketahui memiliki penghambatan terhadap elastase, seperti terpenoid dan flavonoid (Onar et al., 2012). Oleh karena itu, ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C diidentifikasi secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa pada ekstrak dan fraksi tersebut yang diduga memiliki efek penghambatan elastase. Hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun *M. leucadendron* L. dapat dilihat pada Lampiran 16.

Sesuai dengan strukturnya, terpenoid pada umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lipid dan berada dalam sitoplasma sel tumbuhan. Pada penapisan ini, dilakukan identifikasi dengan menggunakan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat. Hasil positif berupa bercak ungu ditunjukkan pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, dan fraksi B. Hasil tersebut sesuai dengan literatur bahwa daun *Melaleuca leucadendron* L. mengandung beberapa senyawa terpenoid (Lee & Chang, 1999). Sementara fraksi C menunjukkan hasil negatif (Gambar 4.10.).



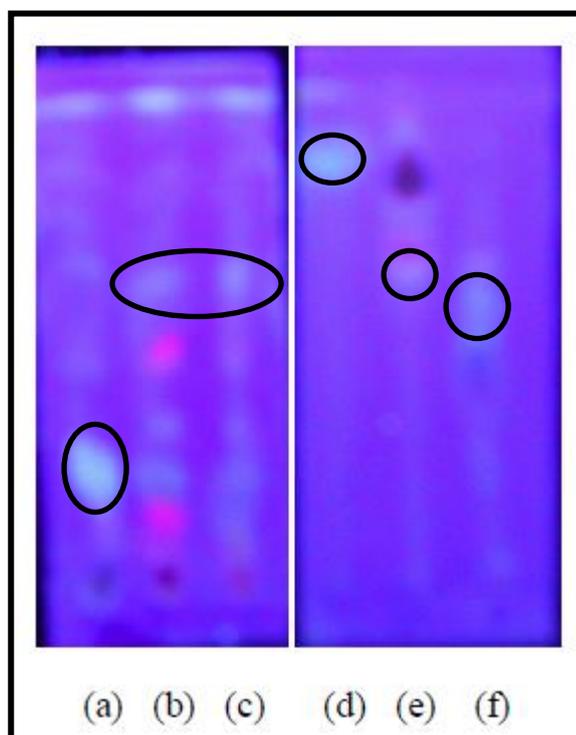
Keterangan: bercak ungu standar *Caryophylli Flos* (a), ekstrak aseton (b), fraksi kloroform (c), fraksi A (d), fraksi B (e), fraksi C (f)

**Gambar 4.10.** kromatogram terpenoid pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun *Melaleuca leucadendron* L. dengan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) disemprot dengan penampak bercak vanilin –asam sulfat diamati secara langsung

Hasil pengujian ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun *M. leucadendron* L. menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi tersebut tidak mengandung senyawa alkaloid. Hasil tersebut sesuai dengan literatur bahwa daun *M. leucadendron* L. tidak mengandung alkaloid (Lee, 1999; Lee & Chang, 1999).

Untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa golongan flavonoid, dilakukan pengujian dengan fluoresensi menggunakan pelarut  $AlCl_3$ . Hasil uji ekstrak ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun *M. leucadendron* L. menunjukkan fluoresensi kuning (Gambar 4.11.). Hal ini menandakan adanya kandungan flavonoid. Hasil ini sesuai dengan literatur bahwa fraksi daun *M.*

*leucadendron* L. mengandung senyawa flavonoid yaitu Leucadenon A-D (Lee, 1999).



Keterangan: fluoresensi kuning standar *Ortosiphonis Folium* (a), ekstrak aseton (b), fraksi kloroform (c), fraksi A (d), fraksi B (e), fraksi C (f)

**Gambar 4.11.** Kromatogram flavonoid pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B, dan C daun *Melaleuca leucadendron* L. dengan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) disemprot dengan Penampang Bercak  $\text{AlCl}_3$  0,5% berfluoresensi kuning pada UV 365 nm

Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987), sehingga tanin dapat mengendapkan gelatin yang merupakan protein. Identifikasi tanin dilakukan dengan pereaksi gelatin 10%. Hasil uji menunjukkan hanya ekstrak aseton saja yang memberikan endapan (positif tanin). Hal tersebut dikarenakan fraksi kloroform, fraksi A, B dan C bersifat kurang polar sehingga senyawa tanin yang bersifat polar tidak dapat tertarik.

Golongan senyawa saponin mempunyai sifat khas yang dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang metode penapisan yang sederhana. Dalam cairan, saponin dapat membentuk busa setelah pengocokan. Metode identifikasi ini

digunakan karena mudah dilakukan, cepat, dan hanya membutuhkan sedikit peralatan (Farnsworth, 1966). Berdasarkan hasil identifikasi, ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun *M. leucadendron* L. tidak mengandung saponin (Lee, 1999; Lee & Chang, 1999).

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Hasil penapisan virtual pada penghambatan elastase menggunakan AutoDock didapatkan 10 peringkat tertinggi: 1) leucadenon B, 2) leucadenon A, 3) casiamin C, 4) leucadenon C, 5) leucadenon D, 6) witanolida, 7) cis-miyabenol C, 8) plukcosida A, 9) witangulatin A, 10) isoarborinol.
2. Persen inhibisi elastase daun *Melaleuca leucadendron* berturut-turut pada konsentrasi 50, 25 dan 12,5 µg/mL, fraksi A (68,3; 57,0; dan 47,6%) dan fraksi B (68,1; 64,0; dan 48,3%) lebih besar jika dibandingkan asam oleanolat (62,4, 55,9 dan 46,5%).

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji *in vitro* lebih lanjut terhadap senyawa lain dari peringkat 10 besar hasil penapisan virtual.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap uji *in vitro* dari isolasi senyawa leucadenon A-D dari ekstrak daun *Melaleuca leucadendron* untuk membuktikan hasil penapisan virtual bahwa senyawa leucadenon A-D merupakan peringkat tertinggi terhadap penghambatan elastase.

## DAFTAR REFERENSI

- Adjuwana & Nur M.A. (1989). *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.
- Alias, M.F, Hashim, A.J. & Kareem, T.A. (2008). Synthesis and Characterization of Some Inorganic Compounds and Study Their Effect in Activity of Laccase Produced by Fungal Isolated *Pleurotus ostreatus*. *Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science* Vol. 21, No.2.
- Budiadi, Kanazawa, Y., Ishii, H.T., Sabarnurdin, M.S., & Suryanto, P. (2005). Productivity of kayu putih (*Melaleuca leucadendron* LINN) tree plantation managed in non-timber forest production systems in Java, Indonesia. *Springer*, 64: 143–155.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., & Ferrier, D.R. (2005). *Lippincott's illustrated review: Biochemistry*. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.
- Dallakyan, S. (2009, September). *MGLTools*. Diambil 4 Agustus 2012, dari PyRx -Virtual Screening Tool: <http://mglttools.scripps.edu/documentation/links/pyrxvirtual>
- Delano, W. L. (2004). *PyMOL User Guide*. Diambil 4 Agustus 2012, dari <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf/>
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 313-337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1-33.

- Dewi et al. (2007). Inhibitory Effect of Koji *Aspergillus terreus* on alfa-Glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10: 3131-3135.
- Dewoto, H.R. (2007). Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*, Volume : 57, Nomor: 7.
- Ditjen POM. (1986). *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Farnsworth N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55: 255-276.
- Getie, M., Schmelzer, C.E.H. & Neubert, R.H.H. (2005). Characterization of Peptides Resulting from Digestion of Human Skin Elastin with Elastase. *Protein: Structure, Function, and Bioinformatics* 61: 649–657.
- Giraldo, J., Serra, J., Roche, D., & Rovira, X. (2007). Assessing Receptor Affinity for Inverse Agonist: Schild and Cheng-Prusoff Method. *Current Drug Targets*: 197-202.
- Hadi, K. (2005). *Pengaruh Sinar Ultraviolet B dan Hormon Genotropin pada Biakan Fibroblas Jaringan Kulit Manusia*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.
- Hayani, E. (2007). Pemisahan Komponen Rimpang Kunci Secara Kromatografi Kolom. *Buletin Teknik Pertanian*, Vol. 12, No. 1.
- Huerta, M., Haseltine, F., Liu, Y., Gregory, D., & Seto, B. (2000, July 17). *NIH Working Definition of Bioinformatics and Computational Biology*. Diambil 4 Agustus, 2012, from <http://www.bisti.nih.gov/docs/compubiodef.pdf>
- IPTEK. (2005). *Tanaman Obat Indonesia*. Diambil 11 Desember, 2012 dari [http://www.iptek.net.id/ind/pd\\_tanobat/view.php?id=79](http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?id=79)

- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology*, 267 (3): 727-748.
- Khan et al. (2012). Human Skin, Aging and Antioxidants. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 6(1): 1-6.
- Kim, J.H., Byun, J.C, Bandi, A.K.R., Hyun, C.G., & Lee, N.H. (2009). Compound with Elastase Inhibitor and Free Radical Scavenging Activities from *Callistemon lanceolatus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol.3 (11): 014-920.
- Kim, S.J. (2010). Effect of 1,2,3,4,6-Penta-O-Galloyl- $\beta$ -D-Glucose on Elastase and Hyaluronidase activities and Its Type II Collagen Expression. *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research*, Vol. 67 No. 2: 145-150.
- Kinoshita, T., Yamaguchi, A., & Tada, T. (2006). Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane Induces Conformational Change and Crystal-Packing Contraction of Porcine Pancreatic Elastase. *Acta Crystallographica*, F62: 623–626.
- Klebe, G. (2005). Virtual Screening: Scope and Limitations. In J. Alvarez, & B. Shoichet (Ed.), *Virtual Screening in Drug Discovery* (p.5). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Langton, A.K., Sherrat, M.J., Griffiths, C.E.M., & Watson, R.E.B. (2010). A new Wrinkle on Old Skin: The Role of Elastic Fibres in Skin Aging. *International Journal of Cosmetic Science*: 1–10.
- Lee, C.K. (1998). A new norlupene from the leaves of *Melaleuca leucadendron*. *Journal of Natural Products*, Vol. 61, No. 3.
- Lee, K.K. & Choi, J.D. (1998). *Areca catechu* L. extract. I. Effects on elastase and Aging. *Journal of Cosmestic Science*, 49: 285-297.
- Lee, C.K. (1999). Leucadenone A-D, the novel class flavanone from the leaves of *Melaleuca leucadendron* L. *Elsevier Science*, 40:7255-7259.

- Lee, C.K. & Chang, M.H. (1999). Four new triterpenes from the heartwood of *Melaleuca leucadendron*. *Journal of Natural Products*, Vol. 62: 1003-1005.
- Lindstrom, W., Morris, G. M., Weber, C., & Huey, R. (2008). *Using AutoDock 4 for Virtual Screening*. La Jolla.
- Lyons, T., Fisher, L., Varma, S., & Chen, D. (2005). *Creating a Smart Virtual Screening Protocol, Part 1: Preparing the Target Protein*. Diambil 4 Agustus, 2012, dari [http:// www.accelrys.com/cases](http://www.accelrys.com/cases).
- McPherson, R.A. & Pincus, M.R. (2007). *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods 21<sup>st</sup> edition*. Philadelphia: Elsevier.
- Moon, J.Y., Yim, E.Y., Song, G., Lee, N.H., & Hyun, C.G. (2010). Screening of Elastase and Tyrosinase Inhibitory Activity from Jeju Island Plants. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4: 41-53.
- Morris et al. (2009, Oktober 08). *AutoDock*. Diambil 4 Agustus 2012, dari <http://autodock.scripps.edu/>
- Muegge, I., & Enyedy, I. (2003). Virtual Screening. In A. Burger, *Burger's Medicinal Chemistry* (pp. 243-280). Virginia: John Willey and Sons Inc.
- Mukherjee, P.K., Maity,N., Nema,N.K., & Sarkar, B.K. (2011). Bioactive Compounds from Natural Resources Against Skin Aging. *Phytomedicine*, 19: 64– 73.
- Murray et al. (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry (28th ed.)*. New York: McGraw-Hill, 51-71.
- Wurtele, M., Hahn, K., Hilpert, & W., Hohne. (2000). Atomic resolution structure of native porcine pancreatic elastase at 1.1 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56: 520-3.
- O'Boyle, N. M., et al. (2011). OpenBabel: An Open Chemical Toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 33-47.

- Okimoto, N., Futatsugi, N., Fuji, H., Suenaga, Atsushi, & Morimoto, G.(2009). High-Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulation. *PLoS Computational Biology*, V (10), 1-13.
- Olson, A.J. et al. (2001). Automated Docking Of Flexible Ligand To Receptors version 3.0.5. Diunduh tanggal 4 agustus 2012 dari <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-3-user-guide/AutoDock3.0.5 UserGuide.pdf>
- Onar, H.C., Yusufoglu, A., Turker, G. & Yanardag, R. (2012). Elastase, Tyrosinase and Lipoxygenase Inhibition and antioxidant Activity of an Aqueous Extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(5): 716-726.
- Ono et al. (1997). Antioxidative and antihyaluronidase activities of some fructus (fruit of *Foeniculum vulgare* MILLER) constituents from foeniculi. *Food Science Technology International Tokyo*, 3 (1): 53-55.
- Perola, E., Walters, W. P., & Charifson, P. S. (2005). An Analysis of Critical Factors Affecting Docking and Scoring. In J. C. Alvarez, & B. Shoichet (Ed.), *Virtual Screening in Drug Discovery* (pp. 47-81). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Raspi, G., Spinetti, M.C., Brongo, A., Braca, F., & Sbrana, E. (June, 2002). *CZE Assay for the Determination of Pancreatic Elastase in Commercial Preparation*. Simec-02. Santiago de Compostela.
- Reddy, A. S., Pati, S. P., Kumar, P. P., Pradeep, H. N., & Sastry, G. N. (2007). Virtual Screening in Drug Discovery A Computational Perspective. *Current Protein and Peptide Science* (8): 329-351.
- Rini, P., Ohtani, Y., & Ichiura, H. (2012). Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. *Journal Wood Science*.
- Schierz, A. C. (2009). Virtual Screening of Bioassay Data. *Journal of Cheminformatic*, 1: 21-33.

- Sharma, S.K., & Goyal, N. (2011). Biological studies of the plants from genus *Pluchea*. *Annals of Biological Research*, 2(3): 25-34.
- Sigma. Enzymatic Assay of Elastase. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-elastase.html>. 4 Agustus 2012, pukul 14.30.
- Sivamani, P., Singaravelu, G., Thiagarajan, V., Jayalakshmi, T., Kumar, G.R. (2012). Comparative Molecular Docking Analysis of Essential Oil Constituents as Elastase Inhibitors. *Bioinformation* 8(10): 457-460.
- Sudjadi. (1986). *Metode Pemisahan*. UGM Press, Yogyakarta.
- Sun et al. (2011). Immunosuppression effect of Withangulatin A from *Physalis angulata* via hemeoxygenase 1-dependent pathways. *Process Biochemistry*, 46: 482–488.
- Supriyadi, A. (2009). *Sifat antibakteri zat ekstraktif kayu siwak (Salvadora persica Wall.) terhadap Streptococcus sp.* Departemen Hasil Hutan: Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.
- Sussman, J.L., et al. (1998). Protein Data Bank (PDB): Database of Three-Dimensional Structural Information of Biological Macromolecules. *Acta Crystallographica*, 1078-1084.
- Syahdi, R.R. (2012). *Penapisan virtual basis data senyawa tanaman obat di Indonesia sebagai inhibitor enzim-enzim HIV-1*. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia: Depok.
- Thring, T.SA, Hili, P., & Naughton, D.P. (2009). Anti-collagenase, Anti-Elastase and Anti-Oxidant Activities of Extracts from 21 Plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9: 27-38.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 455-461.

- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas (2nd ed)*. New York : Springer, 163-165.
- Wahyono, P. (2008). Effect Tomato (*Lycopersicon pyriforme*) Fruit Extract on The Expression of Collagen Type-1 MMP-1 and MMP-3 on Skin Aging Process. *Journal Kedokteran Brawijaya*, Vol XXIV, No.3.
- Wen, K.C., Fan, P.C., Tsai, S.Y., Shih, I.C., & Chiang, H.M. (2012). *Ixora parviflora* Protects against UVB-Induced Photoaging by Inhibiting the Expression of MMPs, MAP Kinases, and COX-2 and by Promoting Type I Procollagen Synthesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Wishart, D.S. Bioinformatics in Drug Development and Assessment. *From the Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics, August 29-September 2, 2004*, Vancouver : Canada.
- Yanuar, A. (2012). *Penambatan Molekuler*. Laboratorium Komputasi Biomedik dan Rancangan Obat: Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.
- Yanuar, A., Mun'im, A., Lagho, A. B., Syahdi, R. R., Rahmat, M., & Suhartanto, H. (2011). Medicinal Plants Database and Three Dimensional Structure of the Chemical Compounds from Medicinal Plants in Indonesia. *International Journal of Computer Science Issues*, 180-183.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Surat determinasi tanaman *Melaleuca leucadendron* L.

	<b>LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA</b> <b>( Indonesian Institute of Sciences )</b> <b>PUSAT PENELITIAN BIOLOGI</b> <b>( Research Center for Biology )</b>										
	Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612										
			Cibinong, 23 Oktober 2012								
Nomor	: 277/IPH.1.02/If.8/X/2012										
Lampiran	: -										
Perihal	: <u>Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan</u>										
Kepada Yth. Bpk./Ibu/Sdr(i). Munawarohthus Sholikha NPM : 1106107126 Mhs. Univ. Indonesia Fakultas Farmasi Kampus UI Depok, 16424											
Dengan hormat,  Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%;">No.</th> <th style="width: 15%;">No. Kol.</th> <th style="width: 55%;">Jenis</th> <th style="width: 25%;">Suku</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td><i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L.</td> <td>Myrtaceae</td> </tr> </tbody> </table>				No.	No. Kol.	Jenis	Suku	1	-	<i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L.	Myrtaceae
No.	No. Kol.	Jenis	Suku								
1	-	<i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L.	Myrtaceae								
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.											
			 Kepala Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  Dr. Joeni Setijo Rahajoe NIP. 196706241993032004								
											
D:\Ident 2012\Munawarohthus Sholikha.doc\Yayah-Dg											
Page 1 of 1											

**Lampiran 2.** Penggabungan fraksi kolom berdasarkan pola kromatogram KLT

<b>Fraksi (Total 300 mL)</b>	<b>Eluen (mL)</b>	<b>Fraksi Gabungan</b>
n-Heksana-Etil Asetat (10:0)	n-Heksana-Etil Asetat (9:1)	-
n-Heksana -Etil Asetat (10:0)		-
n-Heksana -Etil Asetat (9:1)		A
n-Heksana -Etil Asetat (9:1)		A
n-Heksana -Etil Asetat (8:2)		B
n-Heksana -Etil Asetat (8:2)	n-Heksana -Etil Asetat (5:5)	B
n-Heksana -Etil Asetat (7:3)		C
n-Heksana -Etil Asetat (7:3)		D
n-Heksana -Etil Asetat (6:4)		D
n-Heksana -Etil Asetat (6:4)		D
n-Heksana -Etil Asetat (5:5)		E
n-Heksana -Etil Asetat (5:5)	n-Heksana -Etil Asetat (6:4)	E
n-Heksana -Etil Asetat (4:6)		E
n-Heksana -Etil Asetat (4:6)		E
n-Heksana -Etil Asetat (3:7)		F
n-Heksana -Etil Asetat (3:7)		F
n-Heksana -Etil Asetat (2:8)		F
n-Heksana -Etil Asetat (2:8)	n-Heksana -Etil Asetat (5:5)	F
n-Heksana -Etil Asetat (1:9)		F
n-Heksana -Etil Asetat (1:9)		F
n-Heksana -Etil Asetat (0:10)		F
n-Heksana -Etil Asetat (0:10)		F

**Lampiran 3.** Tabel optimasi aktivitas enzim dengan variasi substrat N-suksinil-ala-ala-*p*-nitroanilin 0,55; 1,1; 2,2; 4,4; dan 8,8 mM dengan unit larutan enzim 0,08 U/mL, waktu inkubasi 15 menit, suhu inkubasi 25 °C dan pH 8

Konsentrasi substrat (mM)		Serapan			Serapan rata-rata	SD	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2	A3				U/mL	U/mg
0,55	U	0,109	0,110	0,110	0,110	0,001	0,054	0,029	0,203
	K	0,053	0,058	0,055	0,055	0,003			
1,10	U	0,134	0,134	0,154	0,141	0,012	0,066	0,035	0,246
	K	0,079	0,075	0,071	0,075	0,004			
2,20	U	0,447	0,373	0,354	0,391	0,049	0,314	0,168	1,175
	K	0,079	0,078	0,076	0,078	0,002			
4,4	U	0,704	0,683	0,695	0,694	0,011	0,615	0,329	2,302
	K	0,081	0,079	0,078	0,079	0,002			
8,8	U	0,648	0,603	0,635	0,629	0,023	0,523	0,280	1,958
	K	0,107	0,105	0,105	0,106	0,001			

Keterangan: U= Larutan uji; K= Larutan kontrol; A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo), U-K = Serapan uji-Serapan kontrol ; U/mL = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mL; U/mg = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mg

**Lampiran 4.** Tabel optimasi aktivitas enzim dengan variasi waktu inkubasi 10; 15; 20 menit dengan konsentrasi substrat 4,4 mM, unit larutan enzim 0,08 U/mL, suhu inkubasi 25 °C dan pH 8

Waktu Inkubasi (Menit)		Serapan			Serapan rata-rata	SD	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2	A3				U/mL	U/mg
10	U	0,299	0,256	0,275	0,277	0,022	0,205	0,164	1,150
	K	0,073	0,071	0,072	0,072	0,001			
15	U	0,704	0,683	0,695	0,694	0,011	0,615	0,329	2,302
	K	0,081	0,079	0,078	0,079	0,002			
20	U	0,442	0,431	0,453	0,442	0,011	0,365	0,147	1,025
	K	0,077	0,076	0,078	0,077	0,001			

Keterangan: U= Larutan uji; K= Larutan kontrol; A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo), U-K = Serapan uji-Serapan kontrol ; U/mL = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mL; U/mg = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mg

**Lampiran 5.** Tabel penghambatan elastase ekstrak aseton daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata- Rata	SD	(B1-B0) / (S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol Blanko B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,524	0,597	0,384	0,502	0,108	0,404	36,2
	S0	0,098	0,087	0,107	0,097	0,010		
25 µg/mL	S1	0,424	0,427	0,436	0,429	0,006	0,310	51,1
	S0	0,116	0,116	0,126	0,119	0,006		
50 µg/mL	S1	0,373	0,403	0,435	0,404	0,031	0,238	62,4
	S0	0,154	0,182	0,161	0,166	0,015		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel;  
S0= Kontrol Sampel;

**Lampiran 6.** Tabel penghambatan elastase fraksi kloroform daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata- Rata	SD	(B1-B0) / (S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
Kontrol Blanko	B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,476	0,457	0,494	0,476	0,019	0,342	46,0
	S0	0,131	0,132	0,138	0,134	0,004		
25 µg/mL	S1	0,509	0,386	0,394	0,430	0,069	0,307	51,5
	S0	0,141	0,111	0,115	0,122	0,016		
50 µg/mL	S1	0,345	0,334	0,371	0,350	0,019	0,154	75,6
	S0	0,195	0,199	0,193	0,196	0,003		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 7.** Tabel penghambatan elastase fraksi A daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata-Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
Kontrol Blanko	B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,420	0,465	0,377	0,421	0,044	0,332	47,6
	S0	0,092	0,083	0,090	0,088	0,005		
25 µg/mL	S1	0,416	0,434	0,398	0,416	0,018	0,273	57,0
	S0	0,130	0,150	0,150	0,143	0,012		
50 µg/mL	S1	0,436	0,437	0,438	0,437	0,001	0,201	68,3
	S0	0,206	0,298	0,204	0,236	0,054		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 8.** Tabel penghambatan elastase fraksi B daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata- Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol Blanko B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,509	0,427	0,393	0,443	0,060	0,327	48,3
	S0	0,114	0,115	0,118	0,116	0,002		
25 µg/mL	S1	0,318	0,361	0,428	0,369	0,055	0,228	64,0
	S0	0,167	0,134	0,122	0,141	0,023		
50 µg/mL	S1	0,424	0,410	0,380	0,405	0,022	0,202	68,1
	S0	0,190	0,218	0,200	0,203	0,014		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 9.** Tabel penghambatan elastase fraksi C daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata- Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol							
Blanko	B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,442	0,486	0,464	0,464	0,022	0,357	43,6
	S0	0,104	0,096	0,120				
25 µg/mL	S1	0,394	0,41	0,461	0,422	0,035	0,302	52,3
	S0	0,128	0,105	0,126				
50 µg/mL	S1	0,305	0,299	0,305	0,303	0,003	0,161	74,5
	S0	0,140	0,145	0,140				

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 10.** Tabel penghambatan elastase fraksi D daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata-Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol Blanko	B0	0,070	0,066	0,078	0,071		
12,5 µg/mL	S1	0,361	0,500	0,456	0,439	0,071	0,337	46,8
	S0	0,104	0,092	0,109	0,102	0,009		
25 µg/mL	S1	0,455	0,516	0,410	0,460	0,053	0,338	46,7
	S0	0,129	0,122	0,116	0,122	0,007		
50 µg/mL	S1	0,380	0,381	0,407	0,389	0,015	0,249	60,8
	S0	0,151	0,137	0,134	0,141	0,009		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 11.** Tabel penghambatan elastase fraksi E daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata-Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol Blanko	B0	0,070	0,066	0,078	0,071		
12,5 µg/mL	S1	0,415	0,481	0,532	0,476	0,059	0,375	40,9
	S0	0,097	0,094	0,113	0,101	0,010		
25 µg/mL	S1	0,533	0,358	0,441	0,444	0,088	0,348	45,1
	S0	0,096	0,092	0,100	0,096	0,004		
50 µg/mL	S1	0,347	0,325	0,282	0,318	0,033	0,211	66,7
	S0	0,108	0,106	0,107	0,107	0,001		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 12.** Tabel penghambatan elastase fraksi F daun *Melaleuca leucadendron* L.

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata- Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol Blanko B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,783	0,744	0,631	0,719	0,079	0,617	2,6
	S0	0,092	0,117	0,097	0,102	0,013		
25 µg/mL	S1	0,545	0,512	0,426	0,494	0,061	0,398	37,2
	S0	0,091	0,096	0,103	0,097	0,006		
50 µg/mL	S1	0,442	0,375	0,345	0,387	0,050	0,281	55,6
	S0	0,107	0,103	0,108	0,106	0,003		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 13.** Tabel penghambatan elastase terhadap asam oleanolat

Konsentrasi		A1	A2	A3	Rata- Rata	SD	(B1-B0) /(S1-S0)	% Inhibisi
Blanko	B1	0,742	0,675	0,698	0,705	0,034	0,634	
	Kontrol Blanko B0	0,070	0,066	0,078	0,071	0,006		
12,5 µg/mL	S1	0,432	0,428	0,470	0,443	0,023	0,339	46,5
	S0	0,097	0,105	0,111	0,104	0,007		
25 µg/mL	S1	0,321	0,464	0,348	0,378	0,076	0,279	55,9
	S0	0,098	0,097	0,100	0,098	0,002		
50 µg/mL	S1	0,346	0,394	0,287	0,342	0,054	0,238	62,4
	S0	0,105	0,105	0,103	0,104	0,001		

Keterangan: A1= Serapan pertama; A2= Serapan kedua; A3= Serapan ketiga (triplo); S1= Sampel; S0= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Lampiran 14.** Tabel kinetika penghambatan elastase terhadap fraksi B daun *Melaleuca leucadendron* L.

Substrat	1/S	V0 (Tanpa Inhibitor)			Rata-Rata	SD	1/V0
4,4	0,2	0,694	0,613	0,697	0,668	0,048	1,497
2,2	0,5	0,332	0,299	0,335	0,322	0,020	3,106
1,1	0,9	0,206	0,199	0,211	0,205	0,006	4,870
0,55	1,8	0,162	0,142	0,171	0,158	0,015	6,316

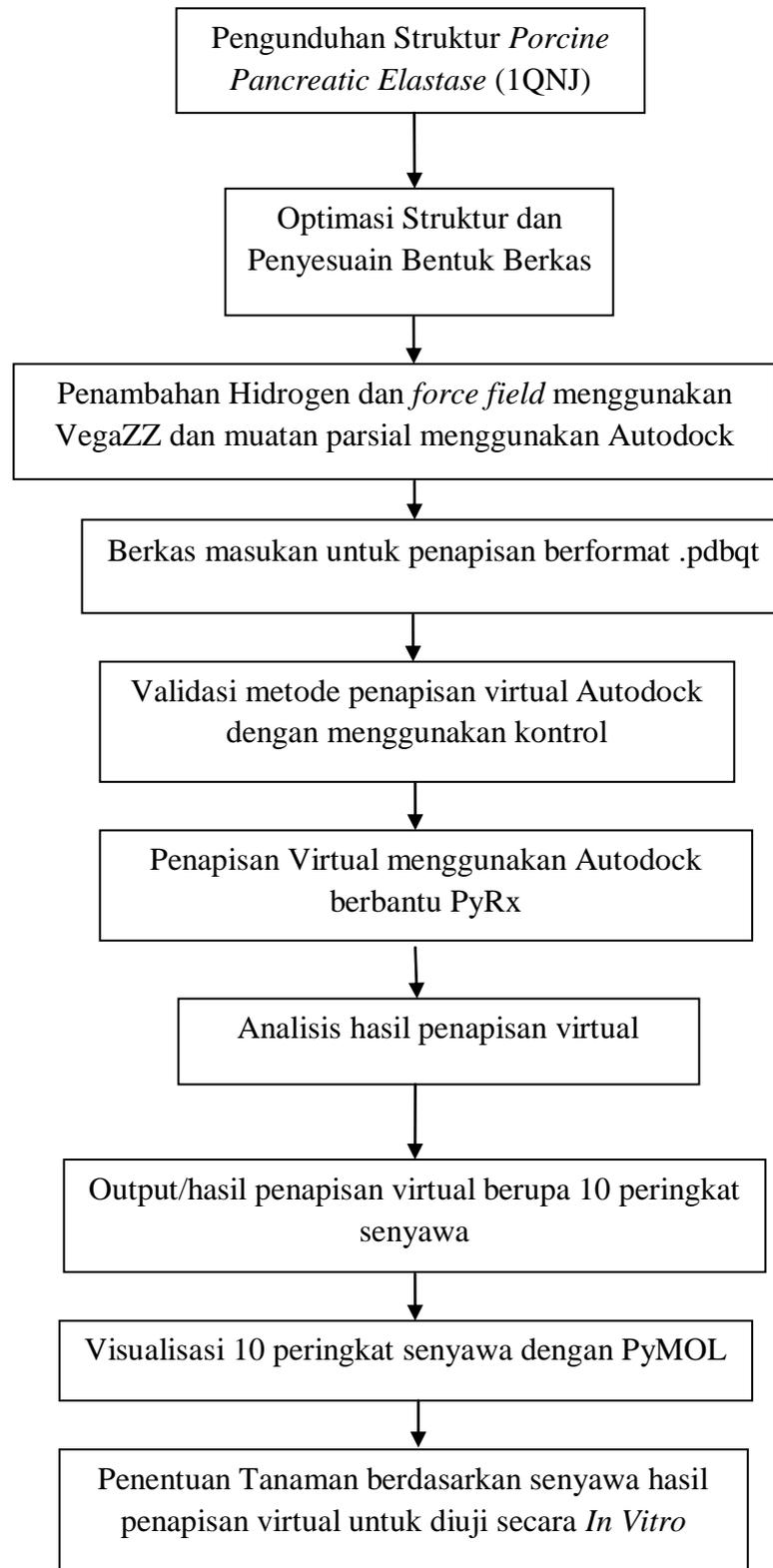
V1 (Inhibitor 12,5 µg/mL)			Rata-Rata	SD	1/V1
0,395	0,665	0,554	0,538	0,136	1,859
0,335	0,294	0,307	0,312	0,021	3,205
0,216	0,211	0,166	0,198	0,028	5,059
0,140	0,129	0,127	0,132	0,007	7,576

**Lampiran 15.** Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten fraksi B daun *Melaleuca leucadendron* L.

	a	b	Km (b/a)	Vmax (1/a)
1/V0 (Tanpa Inhibitor)	1,494	2,885	1,93	0,67
1/V1 (Inhibitor 12,5 µg/mL)	1,423	3,531	2,48	0,70

**Lampiran 16.** Tabel hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak aseton, fraksi kloroform, fraksi A, B dan C daun *Melaleuca leucadendron* L.

Golongan senyawa	Pereaksi	Standar/ Pembanding	Daun <i>Melaleuca leucadendron</i> L.				
			Ekstrak Aseton	Fraksi Kloroform	Fraksi A	Fraksi B	Fraksi C
Sterol- Terpen	pereaksi	bercak ungu	bercak	bercak ungu	bercak	bercak	Tidak
	semprot vanilin-asam sulfat	( <i>Caryophylli Flos</i> )	ungu (+)	(+)	ungu (+)	ungu (+)	ada bercak (-)
Alkaloid	pereaksi	Endapan	tidak ada	tidak ada	tidak ada	tidak ada	tidak ada
	Dragendorff	jingga ( <i>Chinae Korteks</i> )	endapan jingga (-)	endapan jingga (-)	endapan jingga (-)	endapan jingga (-)	endapan jingga (-)
Flavonoid	pereaksi	fluoresensi	fluoresen	fluoresensi	fluoresensi	fluoresen	fluoresen
	semprot AlCl <sub>3</sub>	kuning ( <i>Ortosiphonis Folium</i> )	si kuning (+)	kuning (+)	kuning (+)	si kuning (+)	si kuning (+)
Tanin	gelatin	endapan	endapan	tidak ada	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		putih ( <i>Psidi Folium</i> )	putih (+)	endapan putih (-)	endapan putih (-)	endapan putih (-)	endapan putih (-)
Saponin	air panas +	Berbusa	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
	HCl 2 N	( <i>Liquiritiae Folium</i> )	berbusa (-)	berbusa (-)	berbusa (-)	berbusa (-)	berbusa (-)

**Lampiran 17.** Skema kerja uji *in silico*

**Lampiran 18.** Skema kerja uji *in vitro*