

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN STUDI *IN SILICO* EKSTRAK BUAH PALA (*Myristica fragrans* Houtt)

Bina Lohita Sari^{1*}, Nyanyu Siti Aminah Lily Elfrieda, Kasman Marsuan, Puput²
Sapitri, Abdurrahman Hafidh

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Jl. Pakuan 1 Ciheuleut, Bogor, Indonesia, 16144

²Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Harapan Ibu Jambi

*Korespondensi: binalohitasari@unpak.ac.id

ABSTRAK

Antioksidan adalah senyawa yang dapat mencegah atau memperlambat kerusakan sel, sehingga melindungi sistem biologis di dalam tubuh. Salah satu enzim yang dapat melindungi sel-sel dalam tubuh akibat serangan radikal bebas adalah *superoxide dismutase* (SOD). Senyawa aktif berupa metabolit sekunder dari bahan alam, umumnya mempunyai aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji *in vitro* aktivitas antioksidan ekstrak buah Pala (*Myristica fragrans* Houtt), menentukan senyawa aktif dan analognya secara uji *in silico* penambatan molekuler. Senyawa analog diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat obat dengan bioavailabilitas yang baik. Metode maserasi dengan pelarut etanol dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kental, kemudian dikeringkan dengan *vacuum dryer*. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan pereaksi 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil) atau DPPH. Pengumpulan senyawa aktif pada buah Pala menggunakan basis data KnapSack dan metode penambatan molekuler menggunakan *AutoDock Tools* dengan target enzim SOD dari PDBID:4A7G. Hasil aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah Pala sebesar $100,52 \pm 1,06$ ppm. Hasil penambatan molekuler dengan nilai penambatan yang lebih negatif dari senyawa lainnya, adalah senyawa α -pinen, borneol, myristicin dan analog isoeugenol yaitu methyl isoeugenol dengan nilai ΔG sebesar $-4,18 \pm 0,01$; $-4,00 \pm 0,02$; $-3,28 \pm 0,028$ dan $-3,23 \pm 0,01$ kkal/mol. Ketiga senyawa (α -pinen, myristicin, dan methyl isoeugenol) berikatan dengan residu His110 yang berperan sebagai asam amino aktif inhibitor antioksidan.

Kata kunci: AutoDok Tools, DPPH, studi *in vitro*, *in silico*

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can prevent or slow damage to cell, thereby protecting biological systems in the body. One of the enzymes that can protect cells in the body from free radical attack is *superoxide dismutase* (SOD). The active compounds of secondary metabolites from natural compounds, generally have antioxidant activity. This study aims to perform an *in vitro* test as antioxidant activity of *Myristica fragrans* Houtt fruit extract, to determine the active compound and its analogues by *in silico* test of molecular docking. The analog compounds are expected to be used as drug candidates with good bioavailability. The maceration method with ethanol solvent was carried out to obtain a crude extract, then use a vacuum dryer to dry the crude extract. The determination of antioxidant activity use 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl reagent or DPPH. To collect the active compounds in *Myristica fragrans* fruit is used KnapSack database and the molecular docking method used *AutoDock Tools* with the PDBID:4A7G target of the SOD enzyme. The antioxidant activity result of the ethanol extract of *Myristica fragrans* fruit fruit was 100.52 ± 1.06 ppm. The results of molecular docking with more negative values than the other compounds were the compounds of α -pinen, borneol, myristicin and the isoeugenol analogue, methyl isoeugenol with ΔG values of -4.18 ± 0.01 ; -4.00 ± 0.02 ; -3.28 ± 0.028 and -3.23 ± 0.01 kcal/mol. The three compounds (α -pinen, myristicin and methyl isoeugenol) binds to the His110 residue which acts as an active amino acid as an antioxidant inhibitor.

Keywords: AutoDok Tools, DPPH, *in vitro*, *in silico* study

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas yang dihasilkan secara terus-menerus selama proses metabolisme normal, dianggap sebagai penyebab terjadinya kerusakan fungsi sel-sel tubuh yang akhirnya menjadi pemicu timbulnya penyakit degenerative [1]. Radikal bebas dapat diatasi dengan penggunaan antioksidan, yaitu senyawa yang dapat melindungi sistem biologis di dalam tubuh, contohnya enzim *superoxide dismutase* (SOD), catalase dan glutathione *peroxydase*. Kekurangan salah satu komponen ini dapat menyebabkan penurunan status antioksidan dan mengakibatkan perlindungan terhadap serangan *Reactive Oxygen Species* (ROS) menjadi lemah [1].

Sampai saat ini, Indonesia merupakan penghasil pala terbesar di dunia (70-75%) [4]. Tanaman pala (*Myristica fragrans* Houtt) memiliki senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, dan pada ekstrak buah pala ditemukan senyawa myristin, isoeugenol dan eugenol [5]. Berdasarkan studi literatur, beberapa buah yang mempunyai aktivitas antioksidan diantaranya buah naga, minyak daging buah alpukat, buah pisang, dan buah jeruk manis dengan nilai IC_{50} sebesar 73,2772; 116,4; 2332,08; dan 333,7 ppm [6]. Berdasarkan kandungan senyawa metabolit sekunder pada buah pala [4], maka dilakukan penentuan aktivitas antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi *in vitro* aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol buah pala, dan menentukan studi *in silico* untuk mendapatkan senyawa aktifnya. Salah satu penentuan aktivitas antioksidan menggunakan pereaksi 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil atau DPPH, yang mengandung radikal bebas dan merupakan pereaksi yang stabil, akan bereaksi dengan antioksidan [7]. Senyawa aktif buah pala dapat diunduh dari basis data KnapSack. Penambatan molekuler dengan perangkat lunak AutoDock memiliki keunggulan pada pose ligan yang ditemukan yaitu hampir 80% serta volume molekul dan ikatan hidrogen cenderung lebih baik daripada metode yang lainnya [8].

Beberapa senyawa bahan alam, mempunyai bioavailabilitas yang rendah misalnya permeabilitas membran yang rendah. Senyawa analog akan meningkatkan lipofilisitasnya sehingga bioavailabilitas akan meningkat [9]. Sehingga pada penelitian ini, melalui studi *in silico* ditentukan senyawa induk dan analognya

untuk memprediksi senyawa dengan aktivitas antioksidan yang lebih kuat.

2. METODE PENELITIAN

Bahan:

Bahan yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah: buah pala dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor (BALITTRO), butil hidroksi toluen/BHT (Sigma Aldrich®), DPPH, etanol 96%, dan metanol (Merck®).

Bahan yang digunakan untuk uji *in silico* adalah: Struktur tiga dimensi target enzim SOD yang digunakan dari Protein Data Bank dengan identitas PDBID:4A7G (<https://www.rcsb.org>) dengan nilai resolusi 1,24 Å. Struktur senyawa buah pala dari KnapSack (<http://www.knapsackfamily.com/MetaboliteEcology/result.php>), seleksi senyawa berdasarkan Lipinski's *Rule of Five* menggunakan situs *online* <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>.

Parameter Lipinski's *Rule of Five* yang digunakan yaitu [10]:

- Berat molekul <500 Da
- Donor ikatan hidrogen <5
- Aseptor ikatan hidrogen <10
- LogP <5
- Molar *Refractivity* 40-130

Alat:

Alat-alat yang digunakan untuk uji *in vitro*: Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 20), dan alat-alat gelas.

Alat-alat yang digunakan untuk uji *in silico* adalah: perangkat keras laptop Asus X441MA-GA012T dengan spesifikasi RAM (*Random Access Memory*) 4.00 GB, perangkat lunak AutoDock Tools®

(<http://vina.scripps.edu/download.html>),

Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download-thank-you>), dan GaussView5.0.9

(<https://electrochemistrylibrary.wordpress.com/category/program-s/>).

Metode

Metode *In Vitro*

Buah pala yang telah dikumpulkan, dideterminasi di Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, dilakukan sortasi basah (pencucian, perajangan, pengeringan), sortasi kering (pengemasan, penyimpanan), dan pengujian mutu simplisia.

Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Pala

Sebanyak 500 g serbuk buah pala, di maserasi dengan 5 L etanol (dilakukan remaserasi sebanyak dua kali). Ekstrak dikentalkan dengan *rotary evaporator* kemudian dibuat ekstrak kering dengan *vacuum dryer*. Perhitungan rendemen ekstrak:

Rendemen ekstrak

$$= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100 \%$$

Penentuan Kadar Air

Menggunakan metode gravimetri sebanyak 2 gram simplisia dan ekstrak. Kadar air simplisia dan ekstrak tidak boleh lebih dari 10 % [10]. Perhitungan % kadar air:

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \%$$

Penentuan Kadar Abu

Sebanyak 2-3 gram simplisia dan ekstrak dipijarkan dalam tanur 600°C, kemudian diinginkan dan ditimbang hingga mendapatkan bobot yang tetap. Kadar abu simplisia dan ekstrak tidak boleh lebih dari 6% [11]. Perhitungan % kadar abu:

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{C - A}{B} \times 100 \%$$

Keterangan:

A = berat krus porselin yang telah dipijarkan

B = sampel

C = berat krus porselin + abu

Identifikasi Fitokimia

Uji Flavonoid

Simplisia dan ekstrak masing-masing ditambahkan 10 ml air, dipanaskan selama 5 menit. Sebanyak 5 mL filtrat ditambah 0,5 gr serbuk Magnesium (Mg) dan 10 tetes HCl pekat kedalam. Hasil positif bila menghasilkan warna merah atau jingga [12].

Uji Tanin

Simplisia dan ekstrak masing-masing 10 % gelatin. Bila mengandung tanin terhidrolisis membentuk endapan putih kemudian bila sampel ditambahkan FeCl₃ akan membentuk warna hijau biru kehitaman positif untuk tanin terkondensasi [12].

Uji Alkaloid

Simplisia dan ekstrak dilarutkan dalam asam sulfat 2 N, ditambahkan masing-masing dengan

pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat memberikan hasil endapan warna putih, merah, dan cokelat kehitaman [12].

Uji Saponin

Simplisia dan ekstrak ditambahkan 10 mL air panas lalu dinginkan, kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Ciri khas saponin adalah membentuk busa setinggi 1-10 cm yang dapat stabil dalam waktu 10 menit, setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang [12].

Uji Aktivitas Antioksidan

Menggunakan larutan DPPH 1 mM, larutan standar BHT 2, 4, 6, 8, 10 ppm, dan larutan ekstrak etanol buah pala 20, 40, 80, dan 100 ppm. Melakukan penentuan panjang gelombang maksimum pada 500 – 530 nm, waktu inkubasi maksimum selama 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 menit.

Preparasi larutan standar dan ekstrak masing-masing ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dengan metanol sampai 10 mL, didiamkan sampai waktu inkubasi maksimum dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Metode *In Silico*

Pemisahan Makromolekul

Nilai resolusi makromolekul PDBID:4A7G adalah 1,24 Å dengan ligan alami 4-(4-methylpiperazin-1-yl) quinazoline menunjukkan struktur target sangat teratur dan dapat terlihat setiap atomnya dalam kerapatan elektron (<https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/resolution>). Struktur target juga berkorelasi ekspresi dengan struktur tiga dimensi produk gen [13]. Makromolekul dipisahkan dari molekul air dan ligan alami. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools. Hasil pemisahan pada makromolekul tersebut disimpan dalam format *.pdb yang akan digunakan sebagai target penambatan molekul senyawa-senyawa aktif.

Persiapan Senyawa Aktif

Senyawa aktif (ligan) buah pala di seleksi sesuai aturan Lipinski's *Rule of Five* pada situs <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp> [14].

Optimasi Geometri

Ligan yang telah memenuhi aturan Lipinski's, dioptimasi dengan perangkat lunak Gaussian versi GaussView 5.0.9. Optimasi dilakukan untuk mendapatkan konformasi struktur yang paling stabil.

Validasi Metode Penambatan

Validasi dilakukan terhadap ligan alami dan dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali. Nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Parameter dianggap valid jika nilai RMSD $\leq 2\text{\AA}$. Proses ini diperlukan untuk mencari letak konformasi ligan terhadap reseptor dengan memperhatikan koordinat pusat massa struktur dan besar gridbox.

Penambatan Molekuler

Struktur dari makromolekul dan ligan yang sudah siap disimpan dalam folder yang sama untuk memudahkan proses penambatan. Preparasi protein seperti penambahan atom hidrogen dan pengaturan *grid box* (meliputi ukuran x, y, z) sesuai *binding site* sebagai titik tengah (format .pdb diubah menjadi .pdbqt). Proses penambatan molekuler dijalankan melalui *Command prompt* (cmd) untuk kalkulasi autogrid, kemudian melakukan kalkulasi penambatan sampai proses kalkulasi selesai. Parameter yang ditentukan dapat diamati dengan membuka file log.txt melalui *notepad*. Hasil penambatan berupa nilai RMSD dan energi bebas Gibbs (ΔG). Nilai energi bebas Gibbs berdasarkan nilai energi bebas yang lebih negatif dari beberapa senyawa pada buah pala.

Visualisasi Hasil Penambatan Molekuler

Visualisasi hasil penambatan menggunakan aplikasi Discovery Studio untuk menentukan interaksi ligan dengan reseptor. Parameter yang dilihat yaitu residu asam amino dan jenis ikatan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN**Metode *in vitro***

Hasil determinasi menyatakan bahwa buah pala yang digunakan untuk penelitian ini dengan nama latin *Myristica fragrans* Houtt.

Hasil Pembuatan Ekstrak Buah Pala

Ekstrak kental sebanyak 140,7 gr berwarna cokelat tua dengan aroma khas pala. Dihasilkan ekstrak kering sebanyak 53,6 gr berwarna cokelat tua dengan aroma khas pala. Rendemen hasil ekstraksi sebesar 10,72 %.

Hasil Penentuan Kadar Air

Kadar air simplisia sebesar $7,32 \pm 2,18\%$ dan ekstrak buah pala sebesar $4,63 \pm 0,32\%$ memenuhi persyaratan Depkes (2000) tidak lebih dari 10%. Kadar air yang tinggi mengakibatkan pertumbuhan mikroorganisme, sehingga merubah mutu ekstrak [11].

Hasil Penentuan Kadar Abu

Penentuan kadar abu bertujuan untuk mengetahui kandungan mineral yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Kadar abu simplisia sebesar $5,01 \pm 0,38\%$ dan ekstrak buah pala sebesar ekstrak sebesar $4,42 \pm 0,59\%$ memenuhi persyaratan Depkes, 2000.

Hasil Identifikasi Fitokimia

Hasil pengujian fitokimia menunjukkan simplisia dan ekstrak buah pala mengandung senyawa flavonoid, tanin terhidrolisis (reaksi dengan gelatin), tanin terkondensasi (reaksi dengan FeCl_3), alkaloid, dan saponin [5]. Hasil pengujian fitokimia seperti pada Tabel 1.

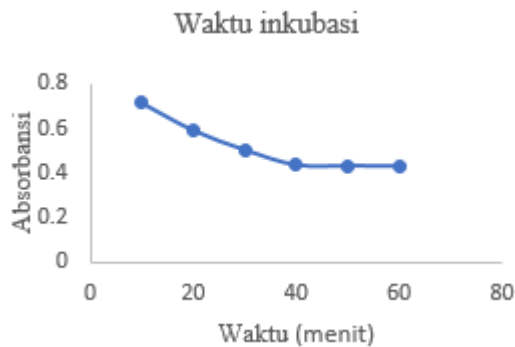
Tabel 1. Kandungan Fitokimia Ekstrak Buah Bisbul

Senyawa	Pengujian	Hasil
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	+
Tanin	Gelatin	+
	FeCl_3	+
Alkaloid	Pereaksi Mayer	+
	Pereaksi Dragendorff	+
	Pereaksi Bouchardat	+
Saponin	Pengocokan dengan air	+

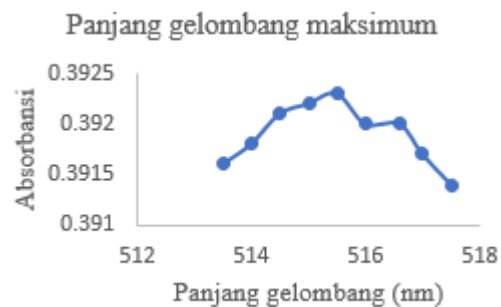
Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Waktu inkubasi optimum selama 40 menit menunjukkan pada menit ke 40 reaksi telah berlangsung sempurna. Panjang gelombang maksimum dihasilkan 515,5 nm, dengan kisaran 513,5 – 517,5 nm adalah daerah visibel dengan

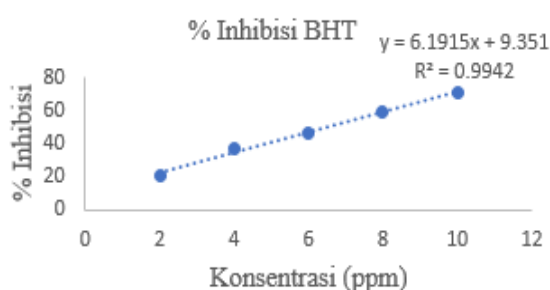
perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning [6]. Kurva panjang gelombang dan waktu inkubasi maksimum ditampilkan pada Gambar 1 dan 2.



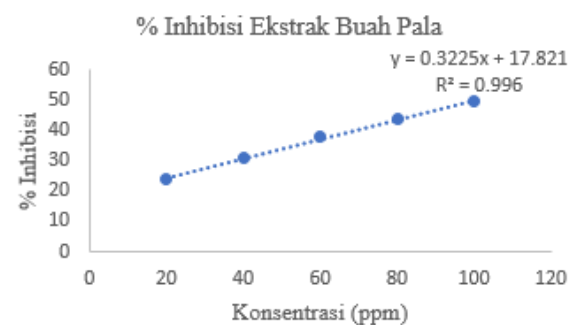
Gambar 1. Kurva waktu inkubasi maksimum



Gambar 2. Panjang gelombang maksimum



Gambar 3. Persen inhibisi larutan standar BHT



Gambar 4. Persen inhibisi ekstrak buah Pala

Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan larutan standar BHT, senyawa sintetik yang digunakan sebagai standar dalam makanan [15]. Hasil %inhibisi BHT dan %inhabsisi sampel disajikan pada Gambar 3 dan 4. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC_{50} yaitu besarnya konsentrasi yang dapat menghambat radikal bebas DPPH sebesar 50%. Jika nilai IC_{50} yang didapat lebih kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin kuat [15]. Nilai IC_{50} ekstrak buah Pala sebesar $100,52 \pm 1,04$ ppm yaitu intensitas sedang pada deret konsentrasi 20-100 ppm, sedangkan nilai IC_{50} BHT sebesar $6,60 \pm 0,05$ ppm (intensitas sangat kuat) pada deret konsentrasi 2-10 ppm.

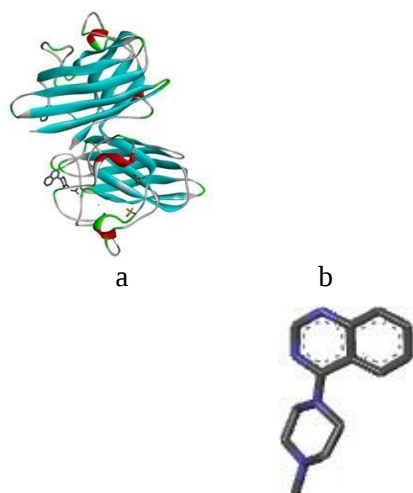
Hasil uji fitokimia dan aktivitas antioksidan dilanjutkan dengan uji *in silico* untuk mendapatkan senyawa aktif pada buah Pala yang berkhasiat sebagai antioksidan.

Hasil Uji *In silico*

Pemisahan Makromolekul

Pemisahan makromolekul target enzim SOD dan ligan alami disimpan dalam format .pdb (Gambar 5). Proses pemisahan tersebut bertujuan untuk menentukan tempat target penambatan yang akan digunakan. Struktur protein PDBID 4A7G dengan ligan alami yaitu 4-(4-methylpiperazin-1-yl) quinazoline dengan klasifikasi sebagai berikut: berasal dari organisme Homo Sapiens, memiliki dua rantai yaitu rantai A dan B. Ligan alami terletak pada rantai A dan situs pengikatannya pada target SOD [16]. Resolusi 1,24 Å hasil dari X-Ray Diffraction, nilai *Resolution Value Free* adalah 0,175. Pemilihan rantai A dikarenakan persentase rantai yang mengalami

penyimpangan lebih kecil yaitu 13% daripada rantai B sebesar 15% [17].



Gambar 5. Struktur Makromolekul PDBID 4A7G (a) dan Ligan Alami 4-(4-methylpiperazin-1-yl) quinazoline (b)

Persiapan Senyawa Aktif

Sebanyak 53 senyawa aktif (ligan uji) pada buah pala yang diperoleh dari Knapsack disimpan dalam format .pdb. Seleksi dengan menggunakan aturan Lipinski *Rule of Five* untuk menentukan tingkat absorpsi atau permeabilitas terhadap lipid bilayer pada tubuh manusia [18]. Hasil seleksi sebanyak 47 senyawa seperti pada Tabel 2. Aturan Lipinski berkaitan dengan keadaan absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi senyawa tersebut dalam tubuh yang dapat digunakan secara oral [19]. Hasil senyawa yang memenuhi aturan Lipinski *Rule of Five* disimpan dalam format file .sdf untuk dilakukan optimasi geometri.

Hasil Optimasi Geometri

Proses optimasi geometri bertujuan untuk menghitung energi terendah dari suatu molekul untuk mengetahui keadaan paling stabil dari suatu molekul. HOFs (*Heat Of Formations*) merupakan parameter termodinamika yang cukup penting dan bermanfaat untuk menggambarkan stabilitas senyawa [20]. Hasil energi optimasi dari 47 senyawa uji telah stabil dan nilai energi kestabilan diantara 1.39504491816 sampai -0.864432592825 a.u.

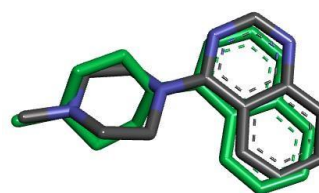
Hasil Validasi Metode Penambatan

Validasi metode penambatan dengan melakukan Penambatan ulang (*redocking*) ligan alami bertujuan untuk mendapatkan prediksi ukuran posisi ligan alami yang ditambatkan ulang sebanyak 10 kali agar sama dengan posisi ligan alami sebelumnya. Validasi metode penambatan

dikatakan valid apabila nilai RMSD yang dihasilkan kurang dari atau sama dengan 2,00 Å [21].

Posisi *gridbox* yang digunakan adalah pada *center_x* = 15,098, *center_y* = -8,985 dan *center_z* = 26,600 sedangkan ukuran *gridbox* *size_x* = 8, *size_y* = 6, *size_z* = 10 serta *exhaustiveness* = 16 yang terpusat pada sisi aktif enzim. *Gridbox* diperoleh dengan optimasi geometri menggunakan perangkat lunak GaussView dengan mengatur sistem optimasi menjadi *semi empirical-PM3*.

Semi empirical memiliki keunggulan yaitu metode yang cepat, sehingga dapat digunakan dalam aplikasi untuk molekul yang besar. Metode semi empirikal yang digunakan dalam penelitian ini adalah PM3 karena memiliki keakuratan yang lebih baik untuk HOFs dan geometri ikatan hidrogennya daripada metode AMI. Pengaturan pada *gridbox* meliputi *center_x*, *_y*, dan *_z*, untuk mengatur letak parameter box pada makromolekul, kemudian *size_x*, *_y*, dan *_z*, untuk menentukan besar/kecilnya *gridbox* untuk ruang berikatan ligan tersebut. Hasil validasi yang diperoleh yaitu 1,032 Å menandakan bahwa pergeseran posisi pengikatan senyawa inhibitor tidak jauh bergeser dari posisi sebelum dilakukan validasi. Berdasarkan nilai RMSD yang diperoleh juga menyatakan bahwa parameter *gridbox* yang digunakan telah tervalidasi. Hasil overlay ligan alami 4A7G dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Overlay Ligan Alami 4A7G
Keterangan: warna hijau (posisi ligan alami) dan warna hitam (posisi *redocking* ligan alami)

Hasil Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler merupakan suatu prosedur komputasi untuk memprediksikan konformasi protein atau molekul asam nukleat (DNA atau RNA), dan ligan yang merupakan molekul kecil atau protein lain atau prediksi struktur antar molekul yang kompleks terbentuk antara dua atau lebih konstituen molekul [22]. Hasil penambatan dinyatakan dengan Energi bebas Gibbs (ΔG) yaitu energi yang dibutuhkan ligan untuk dapat berinteraksi atau berikatan dengan reseptor pada *binding site*. Hasil penambatan Ligan alami (4-(4-methylpiperazin-

1-yl)), Kontrol positif (Kuersetin), dan senyawa uji terdapat pada Tabel 3. Klasifikasi nilai ΔG sebagai berikut yaitu nilai ΔG antara -15 kkal/mol sampai -40 kkal/mol menunjukkan ikatan yang sangat kuat, nilai $\Delta G = -4$ kkal/mol sampai -15 kkal/mol menunjukkan ikatan yang kuat dan nilai ΔG kurang dari -4 kkal/mol menunjukkan ikatan yang lemah [23]. Dihasilkan empat senyawa (α -pinen, borneol,

myristicin, dan methyl isoeugenol) dengan nilai energi bebas Gibbs yang lebih negatif dibandingkan senyawa lain. Senyawa α -pinene diprediksi mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat diantara senyawa lain dalam buah pala.

Tabel 2. Hasil Seleksi Senyawa Uji Berdasarkan Lipinski

No	Senyawa	BM (<5 00 Da)	LogP (<5)	H- Bond Donor (<5)	H- Bond Accept or (<10)	Molar Refractivity (40-130)	Ket
1.	Eugenol	148	1,263	0	1	37,855	-
2.	Isoeugenol	148	1,263	0	1	37,856	-
3.	Licarin B	304	2,656	0	4	73,601	√
4.	(+)- α -Pinene	136	3,079	0	0	51,198	√
5.	(+)-sabinene	136	2,689	0	0	47,119	√
6.	Tetradecanoic acid	228	4,772	1	2	68,713	√
7.	(-)-Licarin A	280	1,613	0	1	35,148	-
8.	Elemicin	144	1,618	0	0	42,224	√
9.	Methyl isoeugenol	178	2,736	0	2	54,253	√
10.	Myristicin	192	2,152	0	3	53,017	√
11.	Safrole	162	2,143	0	2	46,465	√
12.	Borneol	154	2,637	1	1	51,935	√
13.	Dihydroguaiaietic acid	330	4,172	2	4	95,053	√
14.	Nectandrin B	368	4,012	0	5	89,849	√
15.	Fragransol C	356	3,955	1	5	100,443	√
16.	Fragransol D	370	3,675	1	6	100,014	√
17.	Myristicanol A	434	3,330	2	8	116,358	√
18.	Myristicanol B	404	3,321	2	7	109,806	√
19.	Fragransin A2	344	2,199	2	5	34,212	-
20.	Fragransin B1	404	4,216	2	7	107,316	√
21.	Fragransin B2	404	4,216	2	7	107,316	√
22.	Fragransin B3	368	4,012	0	5	89,849	√
23.	Fragransin C1	374	4,208	2	6	100,764	√
24.	Fragransin C2	340	3,775	0	4	85,526	√
25.	Fragransin C3a	340	3,775	0	4	85,526	√
26.	Fragransin C3b	340	3,775	0	4	85,526	√
27.	Fragransin D1	388	4,511	1	6	105,651	√
28.	Fragransin D2	388	4,511	1	6	105,651	√
29.	Fragransin D3	388	4,511	1	6	105,651	√
30.	Fragransin E1	316	2,951	0	4	77,947	√
31.	Fragransol A	374	3,714	2	6	100,867	√
32.	Fragransol B	330	3,181	2	5	90,226	√
33.	Macelignan	328	4,186	1	4	92,959	√
34.	Guaiacin	328	3,842	2	4	92,259	√
35.	Dehydrodiisoeugenol	326	4,679	1	4	34,144	-
36.	Fragransol A	374	3,714	2	6	100,867	√

37.	Fragransol C	356	3,955	1	5	100,443	√
38.	Austrobalignan 7	342	4,214	1	5	92,118	√
39.	Machilin F	312	3,069	0	3	31,178	√
40.	2-(4-Allyl-2-methoxyphenoxy)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanol	344	3,733	2	5	96,148	√
41.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-propanol	388	4,044	1	6	107,587	√
42.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1-propanol	372	3,756	1	6	100,606	√
43.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-1-propanol	404	3,750	2	7	109,252	√
44.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)-1-propanol	352	2,990	0	4	85,465	√
45.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1-propanol	418	4,053	1	7	114,139	√
46.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanol	374	3,741	2	6	102,700	√
47.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanol	404	3,750	2	7	109,252	√
48.	2,3-Dihydro-7-methoxy-2-(3-methoxy-4,5-methylenedioxyphenyl)-3-methyl-5-(1-propenyl) benzofuran	354	4,702	0	5	98,602	√
49.	1,2-Dihydrodehydroguaiaietic acid	326	3,499	2	4	95,559	√
50.	4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol	194	2,137	1	3	55,111	√
51.	2-(4-Allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) propane	340	2,695	0	4	81,119	√
52.	β -O-Dilignol	256	2,414	0	1	70,356	√
53.	1-(2,6-Dihydroxyphenyl)-9[4-hydroxy-3-(p-menth-1-en-8-yloxy) phenyl]-1-nonanone	312	1,513	0	3	32,642	-

Keterangan: √ memenuhi aturan Lipinski

Tabel 3. Hasil Standar Deviasi Energi Bebas Penambatan

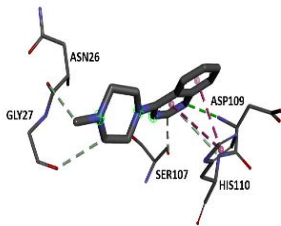
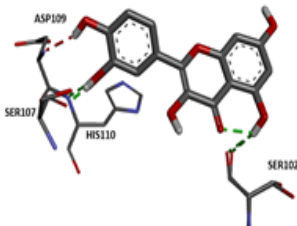
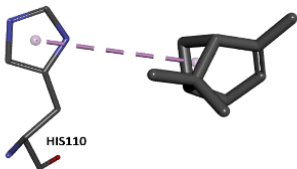
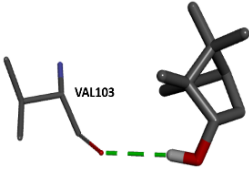
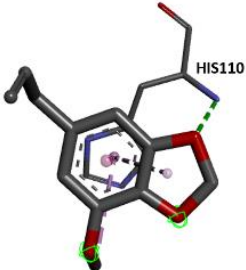
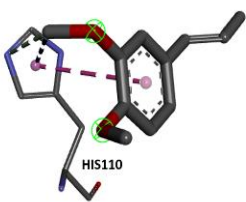
No	Nama Ligan	ΔG (kkal/ Mol) Ulangan 1	ΔG (kkal/ Mol) Ulangan 2	Rata-rata ΔG (kkal/Mol)
1.	4-(4-methylpiperazin-1-yl) quinazoline (ligan alami)	-4,32	-4,29	-4,30±0,02
2.	Kuersetin (Kontrol Positif)	-3,46	-3,45	-3,45±0,00
3.	α -pinene	-4,17	-4,19	-4,18±0,01
4.	Borneol	-4,02	-3,98	-4,00±0,02
5.	Myristicin	-3,30	-3,26	-3,28±0,02
6.	Methyl isoeugenol	-3,24	-3,23	-3,23±0,00

Hasil Visualisasi Hasil Penambatan Molekuler

Visualisasi bertujuan untuk mengetahui perubahan yang terjadi setelah proses penambatan, seperti posisi, konformasi maupun terjadinya interaksi baru antar molekul yang diamati secara visual (Tabel 4). Ligan berikatan dengan sisi aktif pada target. Hasil visualisasi menunjukkan ikatan yang dapat terbentuk antara reseptor dan ligan berupa ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik. Ikatan hidrogen antara ligan dan reseptor pada umumnya merupakan interaksi molekuler yang terjadi pada tubuh manusia karena ikatan hidrogen banyak terdapat pada sistem biologis seperti protein dan asam nukleat [24]. Ikatan hidrogen dapat terjadi antara intermolekul dan intramolekul dengan jarak ikatan yang baik adalah 2,5-3,5 Å [25]. Interaksi hidrofobik merupakan interaksi lemah antara gugus nonpolar ligan dengan residu nonpolar yang bersifat menghindari lingkungan cair dan berperan penting dalam stabilisasi konformasi protein [26].

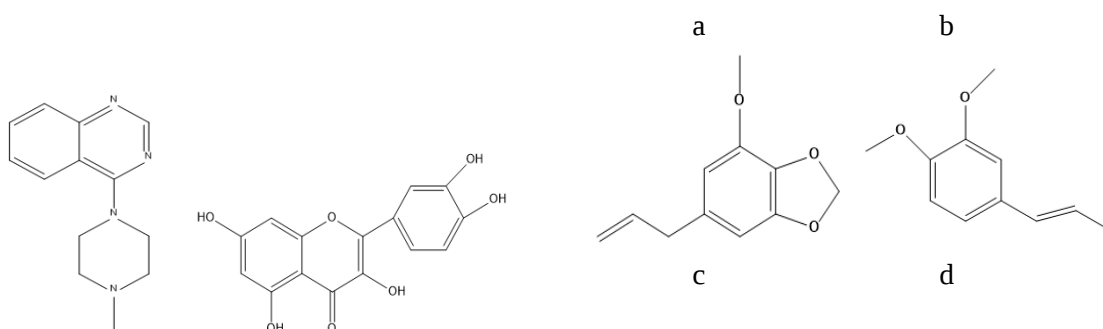
Senyawa ligan alami memberikan nilai ΔG -4,30 kkal/mol paling negatif diantara kontrol positif dan senyawa uji. Interaksi ikatan hidrogen dengan residu asam amino yaitu Asp109, Ser107, Gly27 dan Asn26 dengan jarak ikatan Ser107 sebesar 2,92 Å (Tabel 5). Kontrol positif Kuersetin berikatan dengan His110 dan Ser107 sesuai dengan ligan alami dengan ikatan dari residu asam amino O dengan gugus OH pada ligan. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa α -pinene berikatan dengan residu asam amino yang sesuai yaitu His110, tetapi jarak ikatan yang panjang menunjukkan ikatan yang lemah. Nilai penambatan myristicin dan methyl isoeugenol (suatu analog isoeugenol) lebih positif dibandingkan α -pinen. Berdasarkan struktur, kedua senyawa memiliki kesamaan struktur dengan ligan alami dan kontrol positif yaitu adanya gugus aromatik (Gambar 7).

Tabel 4. Visualisasi 3D Empat Senyawa Buah Pala

No	Nama Ligan	Visualisasi Ikatan 3D
1.	4-(4-Methylpiperazin-1-yl) Quinazoline (ligan alami)	
2.	Kuersetin (Kontrol Positif)	
3.	α -Pinene	
4.	Borneol	
5.	Myristicin	
6.	Methyl isoeugenol	

Tabel 5. Hasil Penambatan Molekul Dan Interaksi Residu Asam Amino

No	Nama Ligan	Residu asam amino yang berikatan	Interaksi residu asam amino-Ligan)	Jarak Ikatan (Å)
1.	4-(4-methylpiperazin-1-yl) quinazoline (ligan alami)	Asp109 Ser107 Gly27 Asn26 His110	OH...NH OH...NH OH...NH NH...OH O...NH	3,05 2,92 3,55 3,24 3,79
2.	Kuersetin (Kontrol Positif)	His110 Ser102 Ser107	O...OH O...OH O...OH	2,72 2,34 1,90
3.	α -pinene	His110	OH...CH	5,38
4.	Borneol	Val103	NH...CH	2,62
5.	Myristicin	His110 His110 His110	OH...O OH...NH NH...CH	3,31 3,94 4,07
6.	Methyl isoeugenol	His110 His110 His110	O...OH NH...CH O...NH	3,44 3,77 4,31



Gambar 7. Struktur ligan alami (a), kuersetin (b), myristicin (c), dan methyl isoeugenol (d).

Kuersetin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena aktivitasnya sebagai pemberi hidrogen (*hydrogen-donating*) karena kandungan hidroksilasi yang cukup, yakni 5 gugus OH dan lokasi gugus hidroksilnya terdapat pada sisi aktif (C3, C5, C3' dan C4') [27]. Berdasarkan hasil penambatan molekuler, interaksi ikatan, dan kesamaan struktur dengan ligan alami dan kontrol positif, maka α -pinen, myristicin dan methyl isoeugenol merupakan senyawa yang

yang diprediksi mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat.

4. SIMPULAN

Berdasarkan uji *in vitro* aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah pala dihasilkan aktivitas antioksidan $100,52 \pm 1,06$ ppm, dan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak diduga adalah α -pinen, myristicin dan methyl isoeugenol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih untuk Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Pakuan yang telah Memberikan kesempatan

untuk mendapat hibah Terapan dengan No 10/LPPM-UP/KPT/VI/2021

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., D'Alessandro, A.G. 2022. Free Radical Properties, Source and Targets, *Antioxidant Consumption and Health*. 2: 48-78.
- [2] Khot, V.S., Upadhye, S.S., Kothali, B.K., Apte, A.K., Kulkarni, A.A., Patil, A.A., Danole, A.B., 2018. Free Radicals, Oxidative Stress and Diseases An Overview. *American Journal of Pharmtech Research*. 8(4): 59-65.
- [3] Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-13.
- [4] Ruhnayat, A., Wahyudi, A., dan Rostiana, O. 2016. Informasi Teknologi Tanaman Rempah dan Obat. Bogor : Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.
- [5] Ginting B., Mustanir, Helwati. H., Desiyana. Septa. L., Mujahid. E. R., 2017, Antioxidant Activity Of N-Hexane Extract of Nutmeg Plant From South Aceh Province, *Jurnal Natural*, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan tanaman Obat dan Obat Traditional, Karanganyar.
- [6] Hartono. B., Chhrisanto, Farfar, I. O., 2019, Pengaruh lama Penyimpanan Terhadap Aktivitas Antioksidan Berbagai Macam Jus Buah Berdasarkan Metode DPPH. *Jurnal Kedokteran Meditek*. Universitas Krida Wacana. 25(2): 75-80.
- [7] Akar, Z., Küçük, M., Doğan, H. 2017. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32(1): 640–647. doi: 10.1080/14756366.2017.1284068
- [8] Oferkin, I.V., Katkova, E., Sulimov, A.V. 2015. Evaluation of Docking Target Functions by the Comprehensive Investigation of Protein-Ligand Energy Minima. *Advances in Bioinformatics*. 1-12.
- [9] Choi, K.Y., Swierczewska, M., Lee, S., dan Chen, X. 2012. Review Protease-Activated drug development, *Theranosttiics*, 2(2): 156-178.
- [10] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. 2001. Experimental and Computational Approaches To Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Setting. *Advanced Drug Delivery Review*. 46(1-3) : 3-26.

- [11] Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Farmakope Herbal Indonesia. Edisi 1, Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- [12] [Depkes} Departemen Kesehatan. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Cetakan I. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawan Obat Tradisional.
- [13] Vicente, I., Baroncelli, R., Morán-Diez, M.E., Bernardi, R., Puntoni, G., Hermosa, R., Monte, E., Vannacci, G., Sarrocco, S. 2020. Combined Comparative Genomics and Gene Expression Analyses Provide Insights into the Terpene Synthases Inventory in *Trichoderma. Microorganisms*, 8(1603): 1-20.
- [14] Hanani. E., 2014, Analisis Fitokimia, EGC, Penerbit Buku Kedokteran.
- [15] Yehye, W.A., Rahman, N.A., Alhadi, A.A., Khaledi, H., Ng, S.W., Ariffin, A. 2012. Butylated Hydroxytoluene Analogs: Synthesis and Evaluation of Their Multipotent Antioxidant Activities. *Molecules*. 17:7645-7665.
- [16] Kershaw, N.M., Wright, G.S.A., Sharma, R., Hasnain, S. 2013, X-ray Crystallography and Computational Docking for the Detection and Development of Protein-Ligand Interactions, *Current Medicinal Chemistry*, 20(4):569-573.
- [17] Rawling, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R.D. 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*. 46:624-632.
- [18] Rachmania, R.A., Supandi., dan Larasati, O.A. 2015. Analisis in-silico senyawa diterpenoid lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculate* Nees) pada reseptor alpha-glucosidase sebagai antidiabetes tipe II. *Pharmacy*. 12 (2): 210-222.
- [19] Hanachi, R., Belaidi, S., Kerassa, A., and Boughdiri, S. 2015. Structure Activity/Property Relationships of pyrazole Derivatives by MPO and QSAR Methods for Drug Design. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. 6 (4): 923-935.
- [20] Wu, Y., Zhang, D., Jiang, X., and Jiang, W. 2014. Fruit and vegetable consumption and risk of type 2 diabetes mellitus : a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Meta-Analysis*. 25(2): 140-147.
- [21] Xiao, W., Wang, D., Shen, Z., Li, S., and Ling, H. 2018. Multi-Body Interactions in Molecular Docking Program Deviced with Key Water Molecules in Protein.
- [22] Dias, R., and Azevedo, W.F. 2008. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*. 9(12):1040-1047. Binding Sites. *Molecules*. 23 (9): 1-22.
- [23] Desiraju. G. R., T. Steiner. 1999. The Weak Hydrogen Bond In Structural Chemistry And Biologycal. India : University of Hyderabad Pass.
- [24] Siswandono, Bambang Soekarjdo. 2000. Kimia Medisinal. Surabaya : Airlangga University Press.
- [25] Syahputra, G., Ambarsari, L., dan Sumaryada, T. 2014. Simulasi Docking Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim12-Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika*. 10(1): 55-67.
- [26] Simamora, R.E.M. 2015. Penambatan Molekul Senyawa Katekin serta Turunannya Pada Teh Hijau Terhadap Protein Fat Mass Obesity (FMO). Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- [27] Winarsi, Hery. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta : Kanisius.