

SKRIPSI

***METABOLITE PROFILING* DAN UJI *IN SILICO* AFINITAS SENYAWA GOLONGAN FITOESTROGEN DALAM FRAKSI N-BUTANOLDARI EKSTRAK ETANOL 96% DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C.Presl) TERHADAP RESEPTOR ESTROGEN BETA**



HAPPY NABILAH EL SHOFI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMAKOLOGI DAN FITOKIMIA
SURABAYA
2020**

Lembar Pengesahan

***Metabolite Profiling* dan Uji *In Silico* Afinitas Senyawa Golongan Fitoestrogen dalam Fraksi N-Butanol dari Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) terhadap Reseptor Estrogen Beta**

SKRIPSI

**Dibuat untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi
pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2020**

Oleh:

**Happy Nabilah El Shofi
051611133018**

**Skripsi Ini Telah Disetujui
Tanggal 11 Agustus 2020 Oleh**

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

**Prof. Dr. apt. Mangestuti A., MS.
NIP. 195004221980022001**

**Prof. Dr. apt. Bambang P. E.W., MS
NIP. 195612171985031004**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Happy Nabilah El Shofi

N I M : 051611133018

adalah mahasiswa Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Tugas Akhir/Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Metabolite Profiling dan Uji In Silico Afinitas Senyawa Golongan Fitoestrogen dalam Fraksi N-Butanol dari Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (Marsilea crenata C. Presl) terhadap Reseptor Estrogen Beta

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Naskah Skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 11 Agustus 2020

Yang membuat pernyataan,



Happy Nabilah El Shofi

051611133018

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Happy Nabilah El Shofi

N I M : 051611133018

Menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui abstrak Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Metabolite Profiling dan Uji In Sitico Afinitas Senyawa Golongan Fitoestrogen dalam Fraksi N-Butanol dari Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (Marsilea crenata C. Presl) terhadap Reseptor Estrogen Beta

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain lain Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 11 Agustus 2020

Yang membuat pernyataan,



Happy Nabilah El Shofi

051611133018

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala nikmat dan karunia-Nya serta shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Metabolite Profiling dan Uji *In Silico* Afinitas Senyawa Golongan FITOESTROGEN dalam Fraksi N-Butanol dari Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* C. Presl) terhadap Reseptor Estrogen Beta”** ini dengan baik. Pada akhirnya, perkenankan penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. apt. Mangestuti Agil, M.S. selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan dan dorongan baik moril maupun materiil sehingga peneliti mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Prof. Dr. apt. Bambang Prajogo E.W., M.S. selaku dosen pembimbing serta yang selalu berkenan membimbing penulis terutama dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak. Dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. apt. Hj. Umi Athiyah, MS. atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan program pendidikan sarjana farmasi.
4. Kepala dan staff Departemen Farmakognosi dan Fitokimia yang telah banyak membantu selama ini.
5. Dr. apt. Idha Kusumawati, M.Si. dan Tutik Sri Wahyuni, S.Si., M.Si., Ph.D. sebagai dosen penguji yang telah membantu dan memberikan banyak evaluasi dalam perbaikan skripsi ini serta ilmu yang berharga.
6. Prof. Dr. apt. Noor Erma Nasution, M.S. selaku dosen wali yang selalu sangat sabar membimbing saya, mega, alya dan bayu dalam

menyelesaikan program pendidikan di fakultas farmasi univertitas airlangga.

7. Seluruh dosen di fakultas farmasi universitas airlangga yang telah memberikan banyak ilmu sebagai bekal di kehidupan mendatang dengan kerangka konsep pola pikir ilmiah.
8. *Support system*-ku (ayah, ibuk, adek), kalian adalah rumah dengan segala kenyamanan yang kalian punya. Terimakasih atas segala doa dan restu kalian.
9. Bapak Apt. Burhan Ma'arif Z. A., M.S. yang turut membantu dan meberikan semangat kepadasaya sehingga skripsi ini selesai dikerjakan.
10. Mas Denis, Mas Reyhan dan Pak Azhar yang meberikan arahan dan saran kepada saya.
11. Febria Tri Erliana (Alya), teman yang selalu ada dikebanyakan kelompok, teman sedoswal, seperjuangan skripsi. Terimakasih banyak sudah memotivasi juga.
12. Anggota grup "Nyonya", mega, sella, lutfa, sakinah, alya, lailatul serta teman-teman OPIUM 2016, terutama kelas A. Terimakasih sudah menjadi teman yang selalu ada selama di Surabaya. Sukses selalu buat kalian.

Demi menyelesaikan skripsi ini tentunya tidak lepas dari keterbatasan penulis. Oleh karena itu, penulis senantiasa mengharap adanya masukan untuk meningkatkan kualitas dari skripsi ini sehingga nantinya dapat memberikan hasil yang terbaik. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan sumbangan yang berharga untuk ilmu pengetahuan.

Surabaya, Agustus 2020

Peneliti

RINGKASAN***METABOLITE PROFILING* DAN UJI *IN SILICO* AFINITAS
SENYAWA GOLONGAN FITOESTROGEN DALAM FRAKSI N-
BUTANOL DARI EKSTRAK ETANOL 96% DAUN SEMANGGI
(*Marsilea crenata* C. Presl) TERHADAP RESEPTOR ESTROGEN
BETA**

Happy Nabilah El Shofi

Marsilea crenata C. Presl merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa golongan fitoestrogen (Mitchel *et al.*, 2013). Secara empiris, tanaman ini telah digunakan sebagai peluruh air seni dan antiosteoporosis (Laswati, 2011). Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa pada beberapa varian pelarut ekstrak dan fraksi daun *M. crenata* C. Presl teridentifikasi golongan senyawa flavonoid, isoflavonoid, kalkon dan terpenoid yang termasuk dalam golongan senyawa fitoestrogen (Rukiana, 2018 dan Sirotkin, 2014). Senyawa golongan fitoestrogen dalam *M. crenata* C. Presl diharapkan mampu menjadi salah satu pilihan alternatif terapi untuk pasien dengan defisiensi estrogen yang minimal efek samping (Aditama *et al.*, 2016). Defisiensi estrogen merupakan suatu keadaan dimana terjadi deaktivasi estradiol menjadi estron dan estriol serta sulfasi estradiol sehingga menurunkan afinitasnya terhadap reseptor estrogen sehingga menyebabkan terjadinya osteoporosis maupun neurodegeneratif (Cui *et al.*, 2013; Katzung *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2016). Terapi farmakologi yang telah diberikan untuk mengatasi defisiensi estrogen salah satunya adalah pemberian *Hormone Replacement Therapy* (HRT) yang diketahui pemberiannya dalam jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara maupun kanker uterus (Katzung *et al.*, 2012 dan Aditama *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hasanah (2019), diketahui bahwa dalam fraksi n-butanol daun *M. crenata* C. Presl mengandung golongan senyawa isoflavonoid melalui skrining fitokimia. Uji aktivitas secara *in vitro* juga dilakukan terhadap fraksi n-butanol daun *M. crenata* C. Presl dan menunjukkan adanya aktivitas estrogenik yaitu sebagai antineuroinflamasi sehingga diduga dalam fraksi terdapat senyawa fitoestrogen. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan *metabolite profiling* untuk mengidentifikasi metabolit dalam fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C. Presl. Metabolit-metabolit

teridentifikasi selanjutnya diuji secara *in silico* untuk mengetahui bagaimana afinitasnya terhadap reseptor estrogen beta (ER β) sehingga dapat diprediksi bagaimana potensi metabolit dalam fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C. Presl untuk mengatasi defisiensi estrogen sehingga dapat disebut sebagai senyawa golongan fitoestrogen. Penelitian ini kemudian dilakukan dengan rancangan penelitian yaitu observasiona deskriptif.

Pada penelitian ini, *metabolite profiling* dilakukan dengan metode UPLC-QToF-MS/MS dengan sampel fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C. Presl. Sebelum proses eluasi sampel pada instrumen, terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel dengan metode *solid phase extraction* (SPE). Pada proses ini, sampel fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C. Presl difraksinasi kembali menggunakan pelarut diklorometana dan metanol. Oleh karena itu, selanjutnya disebut sampel fraksi diklorometana dan sampel fraksi metanol. Preparasi ini dilakukan dengan metode SPE (*solid phase extraction*) dengan tujuan untuk memfraksinasi kembali sampel agar analit (metabolit) dapat terpilah kembali berdasarkan kepolarannya dan meningkatkan konsentrasi analit (metabolit) dalam volume sampel fraksi elusi yang lebih kecil serta meningkatkan efisiensi pada proses eluasi (Lucci dan Nunez, 2014).

Eluasi sampel pada UPLC-QToF-MS/MS dilakukan dengan kolom *reversed-phase* sebagai fase diam. Sedangkan fase gerak digunakan eluen A (99,9% asetonitril + 0,1% asam formiat) dan eluen B (99,9% air + 0,1% asam formiat) secara gradien. Ionisasi metabolit pada spektrometri massa yang terpisahkan setelah proses eluasi ialah menggunakan *electrospray ionization* (ESI) sebagai sumber ion.

Kromatogram dan spektra massa yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan aplikasi MassLynx 4.1. Masing-masing puncak pada kromatogram menunjukkan adanya senyawa yang teridentifikasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan seleksi puncak metabolit terhadap blanko. Pemilihan kandidat metabolit dilakukan dengan menseleksi *calculated mass* dengan perbedaan $m/z \pm 0,0005$ mDa terhadap *measured mass* beserta rumus molekulnya. Prediksi metabolit dilanjutkan berdasarkan *database* Metfrag dengan cara memasukkan rumus molekul serta *calculated mass* yang sebelumnya telah dikurangi dengan massa 1 atom Hidrogen karena adanya protonasi metabolit dalam spektroskopi massa. Pemilihan metabolit selanjutnya didasarkan pada kemiripan antara fragmentasi metabolit pada spektra massa dan fragmentasi oleh Metfrag yang terjadi secara *in silico* yang ditunjukkan oleh nilai skor. Metabolit teridentifikasi selanjutnya dicocokkan kembali pada *database* Pubchem dan Chemspider untuk melihat referensi publikasi senyawa. Struktur metabolit kemudian digambar menggunakan aplikasi Chemdraw Ultra 12.0.

Uji afinitas metabolit teridentifikasi dilanjutkan secara *in silico* yang diawali dengan seleksi metabolit berdasarkan sifat farmakokinetiknya. Prediksi sifat farmakokinetik masing-masing metabolit dilakukan menggunakan aplikasi *online* SwissADME dengan parameter seleksi berupa nilai TPSA serta kemampuannya dalam menembus sawar otak (*Blood Brain Barrier permeant*) maupun kemampuannya terabsorpsi dalam saluran cerna (*Human Intestinal Absorption*). Metabolit terpilih selanjutnya dibuat dalam bentuk 3 dimensi yang paling stabil. Bentuk 3 dimensi masing-masing metabolit tersebut kemudian ditambatkan terhadap protein 1ERE menggunakan aplikasi PyRx dengan metode Autodock Vina. Berdasarkan hasil penambatan, diketahui nilai *binding affinity* dan jenis ikatan yang terjadi antara gugus fungsional metabolit dengan asam amino histidin, glutamin serta arginin yang dapat menunjukkan adanya prediksi aktivitas agonis metabolit terhadap estrogen. Digunakan Biovia Discovery Studio *Visualizer* 2016 untuk memvisualkan ikatan yang terjadi antara metabolit dengan protein 1ERE setelah proses penambatan.

Berdasarkan *metabolite profiling* yang telah dilakukan, teridentifikasi 11 metabolit dari sampel fraksi diklorometana dengan senyawa mayor 5-[6-(2H-tetrazol-5-yl)-2-naphthyl]-2H-tetrazole. Sedangkan pada sampel fraksi metanol teridentifikasi 26 metabolit dengan senyawa mayor [[4-[cyano(phenyl)methylidene]cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]amino] acetate. Senyawa 1-(2-Furoyl)-4-(2-methoxyphenyl)piperazine merupakan metabolit yang teridentifikasi pada kedua sampel dengan retention time sekitar 4,30 menit. Adapun uji afinitas yang telah dilakukan secara *in silico* menunjukkan adanya 15 metabolit yang terprediksi memiliki respon biologis agonis terhadap 17β -estradiol dengan senyawa Ethyl 5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylate merupakan senyawa dengan prediksi ikatan paling kuat yang memiliki nilai *binding affinity* sebesar -6,3.

Metabolit yang teridentifikasi secara prediktif melalui *metabolite profiling* pada penelitian ini, selanjutnya diharapkan dapat dilakukan eluasidasi struktur lebih lanjut untuk memastikan keberadaan metabolit dalam fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* C. Presl Sedangkan afinitas metabolit yang diketahui secara *in silico* selanjutnya diharapkan dapat dijadikan sebagai acuan uji aktivitas pada penelitian selanjutnya.