



Analisa *In Silico* Senyawa Biji Lada Hitam (*Piper nigrum L.*) Terhadap Aktivitas Antioksidan

Elis Nurul Ikhlas

Program Studi Farmasi Universitas Perjuangan Tasikmalaya

Lina Rahmawati Rizkuloh

Program Studi Farmasi Universitas Perjuangan Tasikmalaya

Richa Mardianingrum

Program Studi Farmasi Universitas Perjuangan Tasikmalaya

Alamat: Jl. PETA No.177 Kahuripan Kecamatan Tawang, Kota Tasikmalaya 46115

Korespondensi penulis: richamardianingrum@unper.ac.id

Abstract. Degenerative disease is a health condition of an organ or related tissue whose condition can deteriorate over time due to changes in body cells that affect organ function as a whole. The factor is due to unhealthy life changes such as lack of activity and frequent exposure to harmful substances into the body. Degenerative diseases include hypertension, diabetes, cholesterol, cancer, and death. Harmful substances or free radicals can be inhibited by antioxidants. One drug that has antioxidant activity is ascorbic acid (Vitamin C) which functions as an immune booster and is used by the public because it is effective as an antioxidant and health therapy but there are side effects in the form of gastrointestinal. The research aimed to find candidate drug ingredients from compounds contained in black pepper seeds (*Piper nigrum L.*) as *in silico* antioxidants. The methods used are molecular docking and molecular dynamics. The results showed BLH19 had better toxicity than the comparator drug and had hydrogen interactions that could be stabilized by the amino acid Gln139. The results of molecular dynamic calculations for BLH19 have an RMSD value of 1.5 Å with a ΔG_{Total} of -33.50 Kcal/mol. While the comparator drug has an RMSD value of 1.6 Å with ΔG_{Total} -3.39 Kcal/mol. The results showed that the affinity level of ascorbic acid compared to BLH19 for the 4RP9 receptor was predicted to be a candidate for a new antioxidant drug.

Keywords: Antioxidant, ascorbic acid, *in silico*, black pepper, molecular dynamics.

Abstrak. Penyakit degeneratif merupakan kondisi kesehatan suatu organ atau jaringan terkait yang keadaannya bisa terus menurun seiring waktu karena adanya perubahan sel-sel ditubuh sehingga mempengaruhi fungsi organ secara menyeluruh yang penyebabnya seperti kurangnya aktifitas fisik dan sering terpapar zat berbahaya ke dalam tubuh. Penyakit degeneratif diantaranya hipertensi, diabetes, kolesterol, kanker hingga kematian. Zat berbahaya atau radikal bebas dapat dihambat oleh antioksidan. Salah satu terapi kesehatan yang digunakan sebagai antioksidan yaitu asam askorbat (Vitamin C) yang berfungsi sebagai penambah daya tahan tubuh namun terdapat efek samping berupa gastrointestinal. Tujuan penelitian untuk mencari kandidat bahan obat dari 176 senyawa yang terkandung pada biji lada hitam (*Piper nigrum L.*) sebagai antioksidan secara *in silico*. Metode yang digunakan yaitu *molecular docking* dan *molecular dynamic*. Hasil menunjukkan BLH 19 (*Nigramide K*) memiliki toksisitas yang baik dari obat pembanding (Asam askorbat) dan memiliki interaksi hidrogen yang dapat distabilkan oleh asam amino Gln139. Hasil perhitungan *molecular dynamic* BLH 19 memiliki nilai RMSD 1,5 Å dengan ΔG_{Total} -33,50 Kkal/mol, sedangkan asam askorbat memiliki nilai RMSD 1,6 Å dengan ΔG_{Total} -3,39 Kkal/mol. Dapat disimpulkan bahwa BLH 19 (*Nigramide K*) memiliki tingkat afinitas yang baik dibanding asam askorbat terhadap reseptor 4RP9 sehingga diprediksi dapat dijadikan sebagai kandidat obat baru antioksidan.

Kata kunci: Antioksidan, asam askorbat, *in silico*, lada hitam, *molecular dynamic*.

LATAR BELAKANG

Ilmu pengetahuan dan teknologi mengalami perkembangan yang cukup pesat yang berakibat perubahan pola hidup pada masyarakat yang semakin dinamis. Akibat dari itu terdapat dampak positif dan negatif yang terjadi. Salah satu dampak negatif yang tidak

diinginkan yaitu meningkatnya faktor-faktor resiko penyebab timbulnya penyakit terutama penyakit degeneratif (Budilaksono *et al.*, 2014). Penyakit degeneratif adalah kondisi kesehatan suatu organ atau jaringan terkait yang keadaannya bisa terus menurun seiring waktu ini terjadi karena adanya perubahan pada sel-sel tubuh yang mempengaruhi fungsi organ secara menyeluruh. Penyakit degeneratif diantaranya yaitu kanker, kardiovaskular, stroke, hipertensi, dan diabetes melitus (Mighra *et al.*, 2019). Salah satu penyebab penyakit degeneratif yaitu perubahan gaya hidup tidak sehat seperti kurangnya aktifitas fisik, pola makan yang tidak sehat dan sering disertai terpaparnya zat berbahaya ke dalam tubuh (Sartika *et al.*, 2023).

Radikal bebas adalah setiap molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga molekul ini dapat menyerang makromolekul sel sehingga menjadi sangat reaktif dan mudah menjadi reaksi yang tidak terkontrol sehingga mengalami oksidasi yang menyebabkan terjadinya kerusakan protein, lipid, DNA, penuaan dini, kanker, serangan jantung, dan penyakit degeneratif lainnya (Labagu *et al.*, 2022). Maka dibutuhkan antioksidan karena dapat menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas (Kurniasih *et al.*, 2015).

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas reaktif sehingga membentuk radikal bebas menjadi tidak reaktif, relatif lebih stabil dan tidak lagi mengganggu metabolisme tubuh. Antioksidan dalam tubuh manusia terbatas jumlahnya sehingga jika tubuh terkena paparan radikal bebas berlebihan maka tubuh membutuhkan antioksidan tambahan dari luar untuk menjaga keseimbangan antioksidan dan menghambat terjadinya reaksi oksidasi berlebihan di dalam tubuh (Siagian *et al.*, 2022).

Salah satu jenis tumbuhan sebagai sumber antioksidan yaitu biji lada hitam (*Piper nigrum L.*). Secara empiris masyarakat menggunakan biji lada hitam untuk menambah cita rasa masakan, lada hitam mampu merangsang sekresi dan meningkatkan kinerja pencernaan karena rasa lada hitam memicu produksi asam klorida dalam lambung. Asam klorida tersebut kemudian memecah protein dan memperbaiki proses pencernaan (Susila *et al.*, 2019). Pada penelitian terdahulu secara *in vivo* dengan metode uji labirin pada hewan mencit jantan yang diberi dengan ekstrak biji lada hitam dengan dosis 0,3 g/kg pada pakan dapat menghambat proses penuaan yang ditandai menurunnya daya ingat serta fungsi organ tubuh termasuk otak, sehingga setelah diberi ekstrak biji lada hitam mampu meningkatkan kerja sel saraf dan dapat menghasilkan respon gerak yang lebih baik (Sapitri *et al.*, 2014), pada hasil *in vitro* menjelaskan bahwa ekstrak hidroetanol *Piper nigrum L.* memiliki nilai aktivitas antioksidan metode DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 9,001 $\mu\text{g/mL}$, sehingga dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat (Srinivasan, 2021).

Biji lada hitam mengandung bahan aktif seperti alkaloid, piperine, amida fenolat, asam fenolat, flavonoid jenis quarcetin yang bersifat antioksidan serta minyak essential (Ahmad *et al*, 2019). Adanya aktivitas antioksidan pada senyawa biji lada hitam (*Piper nigrum* L.) maka perlu dikembangkan lebih lanjut menjadi kajian baru terhadap senyawa biji lada hitam secara *in silico*. Metode *in silico* digunakan untuk mempercepat pemilihan suatu senyawa yang akan diisolasi yang digunakan mempelajari interaksi antar senyawa dan enzim, reseptor atau sifat farmakokinetik untuk memprediksi kandidat pencarian obat baru dan memberikan hasil yang cepat (Mardianingrum *et al.*, 2018).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai “Skrining Aktivitas Senyawa dari Biji Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) sebagai Antioksidan Secara *In Silico*”.

KAJIAN TEORITIS

Biji Lada Hitam (*Piper nigrum* L.)

Indonesia merupakan negara yang memiliki banyak rempah-rempah (Salsabila, 2021). Lada dikenal dengan nama merica atau sahang, nama latin (*Piper nigrum* L.) memiliki rasa agak pedas, pahit, dan bersifat hangat dan dikenal sebagai the *King of Spices* atau rajanya rempah-rempah dalam sejarah perdagangan rempah-rempah. Lada hitam merupakan salah satu komoditas rempah-rempah tertua yang diperdagangkan sejak zaman penjajahan Belanda (Karsiwan *et al.*, 2022). Lada hitam merupakan tanaman kaya senyawa seperti minyak lada, minyak lemak dan pati (Zulfa *et al.*, 2020). Selain digunakan rempah, biji lada hitam banyak digunakan masyarakat untuk menambah cita rasa masakan.

Klasifikasi Lada Hitam

Menurut Rita, (2020) klasifikasi tanaman lada hitam (*Piper nigrum* L.) yaitu :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Sub Kingdom	: <i>Virdiplantae</i>
Divisi	: <i>Tacheophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Piperceae</i>
Famili	: <i>Piperceae</i>
Genus	: <i>Piper</i> L
Spesies	: <i>Piper nigrum</i> L.



Gambar 1. Biji Lada Hitam (*Piper nigrum L.*)

Kandungan dan Khasiat Lada Hitam

Lada hitam mengandung berbagai metabolit sekunder yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan dan penyembuh penyakit. Kandungan kimia lada yaitu alkaloid, flavonoid jenis quarcetin fenol, antrakuinon, amida fenolat, asam fenolat, tannin, karbohidrat dan protein (Alaris *et al.*, 2020). Lada hitam banyak digunakan untuk menambah cita rasa masakan dan dapat digunakan sebagai obat herbal. Lada hitam sering dimanfaatkan sebagai obat diare, anti inflamasi, dan perut mulas (Sunaryo, 2015). Lada hitam termasuk salah satu sumber kalium, kalsium, mangan, zat besi, vitamin C dan sedikit vitamin K.

Antioksidan

Antioksidan dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul radikal bebas sehingga dapat menstabilkan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai. Antioksidan berfungsi melindungi sel-sel dari kerusakan karena molekul tidak stabil atau radikal bebas (Rahmadi, 2017). Pembentukan radikal bebas dan ketidakseimbangan antara produksi ROS (*Reaktif Oksigen Species*) ini dapat menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif (*oxidative stress*) merupakan ketidakseimbangan antara radikal bebas (*prooksidan*) dengan antioksidan yang dipicu oleh dua kondisi umum yaitu kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas. Stres oksidatif dapat merusak membran sel, protein, karbohidrat dan asam nukleat yang memicu oksidasi. ROS (*Reaktif Oksigen Species*) merupakan molekul kecil turunan oksigen yang diproduksi sebagai zat antara dalam proses reaksi oksidasi, seperti anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Antioksidan menghambat produksi ROS dengan cara membelah langsung, menurunkan jumlah oksidan di dalam dan di sekitar sel, mencegah ROS untuk mencapai target biologisnya, membatasi penyebaran oksidan seperti yang terjadi selama peroksidasi lipid dan menggagalkan stres oksidatif sehingga mencegah penuaan (Haerani, 2018).

Asam Askorbat

Asam Askorbat atau Vitamin C adalah vitamin yang paling umum digunakan sebagai antioksidan oleh masyarakat. Vitamin C digunakan sebagai obat perbandingan merupakan vitamin larut dalam air dan tersedia pada beberapa sumber makanan dan buah buahan. Vitamin

C dengan dosis yang tepat dapat berfungsi sebagai antioksidan yang efektif dengan cara menghambat radikal bebas di dalam tubuh (Wibawa *et al.*, 2020). Asam askorbat berperan dalam menurunkan kolesterol pada darah dan sintesis kolagen untuk membantu menjaga kesehatan pembuluh kapiler, gigi dan gusi, meningkatkan penyerapan zat besi dalam tubuh (Rahmadi, 2017). Vitamin C memiliki efek samping seperti diare dan mual-muntah, gastrointestinal pun dapat terjadi (Qurrota *et al.*, 2022).

Studi *In Silico*

Studi *in silico* adalah istilah pengujian dengan teknik komputasi menggunakan software tertentu. Studi *in silico* atau dikenal dengan teknik *molekular docking* merupakan metode yang biasa digunakan untuk memprediksi bioaktivitas dari suatu senyawa secara komputasi. *Molekular docking* digunakan untuk mempelajari aktivitas-struktur, data farmakodinamik (potensi, afinitas dan selektivitas), untuk memprediksi sifat farmakokinetik yaitu Absorpsi, distribusi, metabolise, ekskresi dan toksisitas (Ferreira *et al.*, 2015). Metode *in silico* dapat juga digunakan untuk memprediksi aktivitas senyawa dengan melihat jumlah energi bebas ikatan yang terbentuk dalam interaksinya dengan situs obat - protein yang terlibat (Kusuma *et al.*, 2018).

METODE PENELITIAN

Alat

- a. Hardware Spesifikasi Intel®Core™ i3- 1005G1 CPU @ 1.20Ghz 1.19 Ghz. RAM 4.00 GB. Type 64-bit operating system, x64-based processor. Untuk proses dinamika molekular digunakan PC (*Personal Computer*) dengan sistem operasi Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit, Processor Pentium ® Dual-Core CPU E660 @3,60 GHz, 2048 MB of RAM.
- b. Software berupa *ChemOffice* 8.0.3 untuk merancang atau membentuk struktur kimia, *Marvin Sketch* untuk menggambar struktur substrat, *Autodock* untuk proses preparasi serta analisis *docking*, *Discovery Studio* untuk mempresentasikan struktur 3D protein dan analisis hasil *molecular dynamic*, *Molegro Molecular Viewer* (MMV) untuk menganalisis bagaimana interaksi ligan dengan makromolekul, *PyRx* digunakan untuk *docking*, *AMBER16* untuk simulasi *molecular dynamic* dan program webserver *KNApSack* (http://www.knapsackfamily.com/KNApSack_Family/), *RSCB PDB* (<https://www.rcsb.org/>), *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), *PDBSum* (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>), *Pre-ADMET* (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>)

Bahan

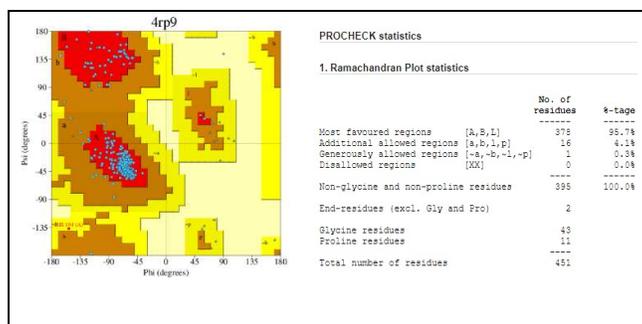
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu reseptor antioksidan yang diunduh dari Protein Data Bank dengan PDB ID : 4RP9 dan 176 struktur senyawa yang terkandung dalam biji lada hitam (*Piper nigrum L.*) yang diperoleh dari *webserver KNApSack*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis dan Preparasi Reseptor

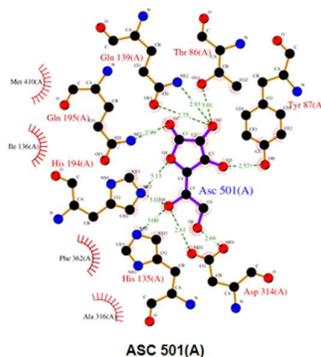
Reseptor yang digunakan pada penelitian ini adalah reseptor antioksidan dengan kode PDB 4RP9 yang diperoleh dari *database Protein Data Bank (PDB)* pada situs <https://rcsb.org/pdb> dengan nilai resolusi sebesar 1,65 Å (Luo *et al.*, 2015). Dalam pemilihan reseptor terdapat beberapa syarat yang harus terpenuhi agar reseptor dapat dikatakan baik dan dapat digunakan untuk penambatan molekul (Ruswanto, 2015).

Analisis reseptor pada Gambar 2 dengan statistik Plot *Ramachandran* dan parameter yang memenuhi syarat dengan protein target kode PDB ID 4RP9 diantaranya parameter *most favoured regions* dengan nilai 95,7% dan *disallowed regions* dengan nilai 0,0%. Hal ini menunjukkan struktur proteinnya mempunyai kualitas yang baik.



Gambar 2. Statistik Plot *Ramachandran* Reseptor 4RP9

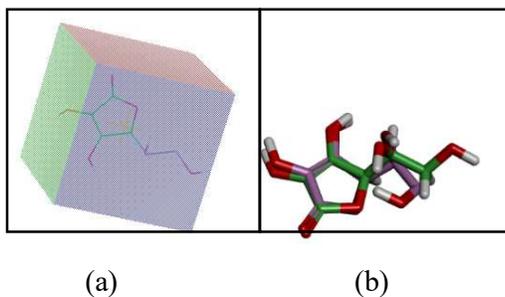
Hasil analisis reseptor 4RP9 mempunyai sisi aktif dari ikatan hidrogen yang terbentuk dengan asam amino yaitu Asp314, His135, His194, Gln195, Gln139, Thr86, Tyr87, sedangkan interaksi hidrofobiknya adalah Ala316, Phe362, Ile136, Met410. Pada Gambar 3 yaitu interaksi yang terjadi antar sisi aktif ikatan reseptor 4RP9.



Gambar 3. Ikatan sisi aktif Reseptor 4RP9

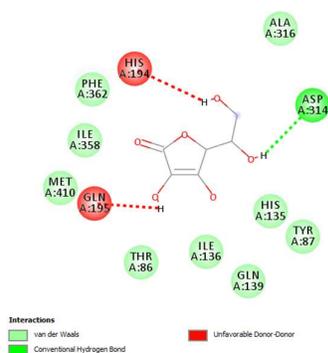
Validasi Reseptor

Validasi reseptor merupakan suatu proses penambatan ulang molekul atau *re-docking* yang menggunakan perangkat lunak Autodock 1.5.6 dengan ligan dari reseptor yang sudah terkompleks. Hasil penambatan molekul dikatakan baik jika hasil dari nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) $< 2,0$ Å, semakin kecil nilai RMSD maka konformasi yang terbentuk akan semakin baik (Muttaqin *et al.*, 2019). Hasil validasi reseptor dari ligan alami dengan kode reseptor 4RP9 menunjukkan ligan alami berada dalam ukuran *grid box* dengan nilai *number of point* 40 x 40 x 40 *dimensions* dan center *grid box* X= -4,133 Y= 44,996 Z= 52,136. Pada *run* ke 93 menghasilkan RMSD dengan nilai 1,568 Å dengan nilai energi bebas *Gibbs* (ΔG) sebesar -2,77 kkal/mol. Posisi ligan dalam *grid box* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Posisi ligan dalam *grid box* (a) dan Bentuk *Overlay* ligan alami dari reseptor 4RP9 awal berwarna abu dan setelah simulasi visualisasi *re-docking* hijau (b).

Ikatan hidrogen yang terbentuk terdiri dari asam amino Asp314 yang tertera pada Gambar 5, semakin banyak ikatan hidrogen maka interaksi ligan dengan residu asam amino akan semakin baik dan stabil (Irwan *et al.*, 2021).

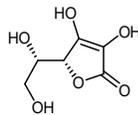
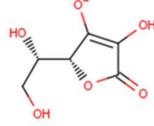
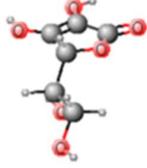
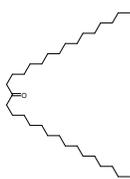
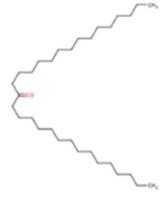
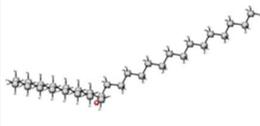
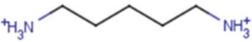
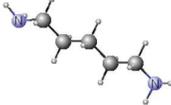


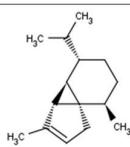
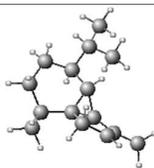
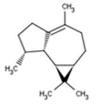
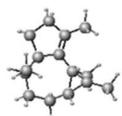
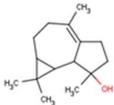
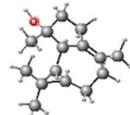
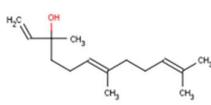
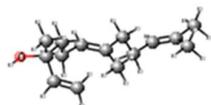
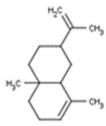
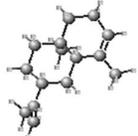
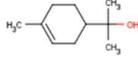
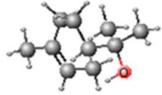
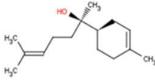
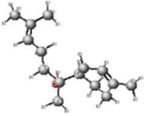
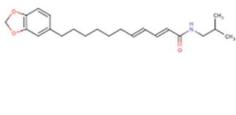
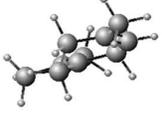
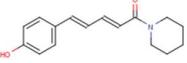
Gambar 5. Visualisasi interaksi pada reseptor 4RP9 setelah di re-docking.

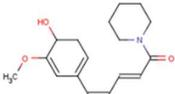
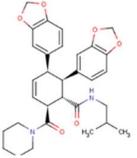
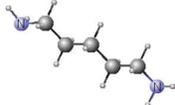
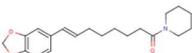
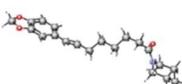
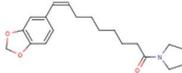
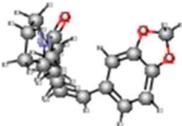
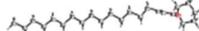
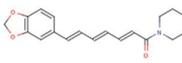
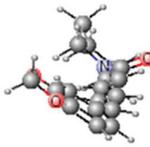
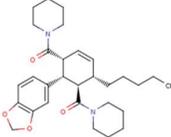
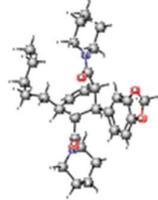
Preparasi Struktur Ligan

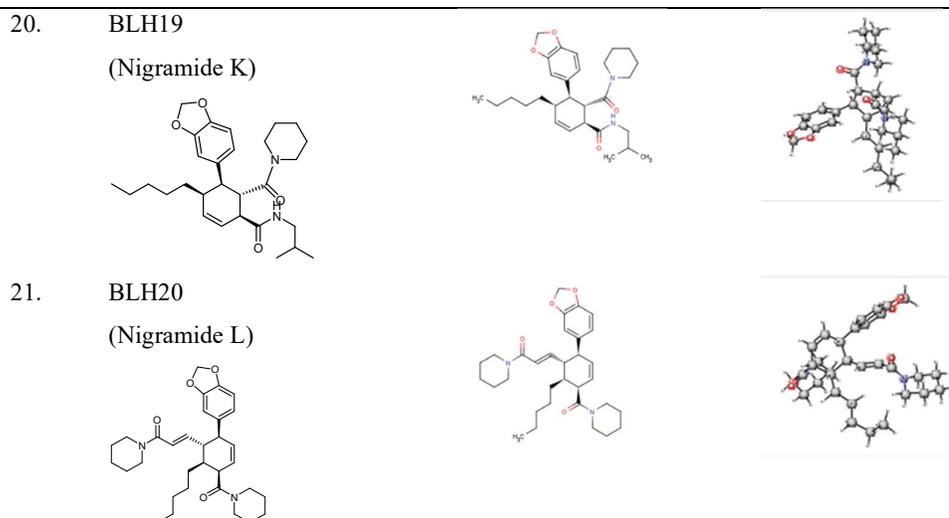
Preparasi ligan dilakukan dengan terhadap 176 senyawa dari Biji lada hitam (*Piper nigrum* L.) yang diunduh dari *webservice knapsack* <http://www.knapsackfamily.com/jamu/top.php> dan 1 senyawa pembanding yaitu Asam askorbat. Seluruh ligan dilakukan optimasi geometri ligan, protonasi pada pH 7,4 agar senyawa yang diperoleh sesuai dengan tubuh manusia dan dilakukan *conformation* dengan tujuan memperoleh posisi molekuler yang paling stabil yang dapat berikatan dengan sisi aktif reseptor yaitu dengan nilai mendekati 0,001 kkal/Å mol, sehingga didapat energi potensial yang rendah dengan hasil *file* format pdb dan sdf (Muttuqin *et al.*, 2019). Hasil preparasi ligan uji dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Preparasi struktur ligan.

No	Nama Senyawa	Protonasi	Konformasi
1.	Obat Pembanding (Vitamin C) 		
2.	BLH1 (Hentriacontan-16-one) 		
3.	BLH2 (Cadaverine) <chem>NCCCCCN</chem>		

No	Nama Senyawa	Protonasi	Konformasi
4.	BLH3 (alpha-Cubebene)		
5.	BLH4 (alpha-Gurjunene)		
6.	BLH5 (Isosparthulenol)		
7.	BLH6 (E)-Nerolidol		
8.	BLH7 (-)-alpha-Selinene		
9.	BLH8 (alpha-Terpineol)		
10.	BLH9 (alpha-Bisabolol)		
11.	BLH10 (10,11-Dihydropiperide)		
12.	BLH11 (Coumaperine)		

No	Nama Senyawa	Protonasi	Konformasi
13.	BLH12 (Dihydroferuperine)		
14.	BLH13 (Chabamide)		
15.	BLH14 (1-[8-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-oxo-7-octadecenyl]piperidine)		
16.	BLH15 (1-[9-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-oxo-8-nonenyl]pyrrolidine)		
17.	BLH 16 (1-(1-Oxo-2-octadecenyl)piperidine)		
18.	BLH17 (1-[7-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4,6-heptatrienyl]piperidine)		
19.	BLH18 (Nigramide H)		



Skrining Aspek Farmakokinetik dan Toksisitas

Skrining toksisitas ini dilakukan dengan tujuan untuk memprediksi toksisitas dengan parameter *ames* untuk memprediksi apakah senyawa tersebut menyebabkan perubahan genetik atau tidak (Guan *et al.*, 2019). Pada uji farmakokinetik parameter yang digunakan yaitu absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME) dalam tubuh manusia. Proses farmakokinetik parameter yang digunakannya yaitu CaCo2 (*Human colon adenocarcinoma*), HIA (*Human Intestinal Absorption*) dan PPB (*Protein Plasma Binding*). Hasil Skrining Toksisitas dan Farmakokinetik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Skrining Toksisitas dan Farmakokinetik

Senyawa	Toksisitas			Farmakokinetik		
	<i>Ames test</i>	<i>Carcino mouse</i>	<i>Carcino rat</i>	CaCo2	HIA(%)	PPB(%)
Asam						
Askorbat						
(Obat	<i>Mutagen</i>	(-)	(-)	2,48	33,15	5,30
Pembanding)						
BLH1	<i>Non-mutagen</i>	(+)	(-)	54.63	100	100
BLH2	<i>Non-mutagen</i>	(+)	(+)	19.27	86.31	0.00
BLH3	<i>Non-mutagen</i>	(-)	(+)	23.63	100	100
BLH4	<i>Non-mutagen</i>	(-)	(+)	22.32	100	100
BLH5	<i>Non mutagen</i>	(-)	(-)	54,3	100	98,28
BLH6	<i>Non-mutagen</i>	(-)	(-)	26.61	100	100
BLH7	<i>mutagen</i>	(-)	(+)	23.63	100	100
BLH8	<i>mutagen</i>	(-)	(-)	50.80	100	23.41
BLH9	<i>Non mutagen</i>	(-)	(-)	51,10	100	90,29
BLH10	<i>mutagen</i>	(+)	(-)	53.95	95.81	92.51

Senyawa	Toksistasitas			Farmakokinetik		
	<i>Ames test</i>	<i>Carcino mouse</i>	<i>Carcino rat</i>	CaCo2	HIA(%)	PPB(%)
BLH11	<i>mutagen</i>	(+)	(-)	30.89	95.43	96.91
BLH12	<i>mutagen</i>	(+)	(-)	36.38	95.42	75.52
BLH13	<i>Non mutagen</i>	(-)	(-)	37,58	96,57	89,45
BLH14	<i>mutagen</i>	(-)	(-)	55.33	98.08	94.71
BLH15	<i>mutagen</i>	(-)	(-)	55.33	98.08	96.07
BLH16	<i>mutagen</i>	(+)	(-)	55.30	98.05	95.74
BLH17	<i>Non-mutagen</i>	(-)	(-)	57.35	100	100
BLH18	<i>Non mutagen</i>	(-)	(-)	47,84	97,38	90,79
BLH19	<i>Non mutagen</i>	(-)	(-)	41,90	96,24	90,90
BLH20	<i>mutagen</i>	(-)	(-)	50.01	97.43	96.18

Ket : -CaCo2 (<4 rendah; 4-70 sedang; 70-100 tinggi) ■ Tidak memenuhi Pre-ADMET
 -HIA (0-20% buruk; 20-70% sedang; 70-100% baik) ■ Memenuhi Pre-ADMET
 -PPB (<90% terikat lemah; >90% terikat kuat) ■ Nilai PPB batas toleransi

Berdasarkan hasil skrining toksistasitas senyawa dari biji lada hitam, terdapat 5 senyawa yang diprediksi lolos dengan kriteria uji toksistasitas yaitu senyawa BLH5, BLH9, BLH13, BLH18 dan BLH19 yang terbukti tidak menimbulkan karsinogen terhadap tikus ataupun mencit. Pada obat pembanding asam askorbat memiliki toksistasitas dengan keadaan mutagenik yang bersifat karsinogenik sehingga menyebabkan senyawa menjadi mutagen dan dapat menyebabkan kelainan pada tubuh. Hasil skrining toksistasitas dan farmakokinetik yang memenuhi syarat yang baik dalam tubuh yaitu senyawa BLH13, dari ke 5 senyawa tersebut pada nilai CaCo2 berada di kategori sedang sehingga hal tersebut diketahui untuk menentukan nilai permeabilitas senyawa obat yang diberikan secara oral dan dapat menembus membran biologis. Pada nilai HIA berada pada kategori baik sehingga dikatakan dapat di absorpsi dengan baik untuk penyerapan obat pada usus manusia. Pada aspek PPB diperlukan hasil yang lemah dengan nilai <90% agar pada saat berikatan dengan plasma tidak terjadinya ikatan yang kuat sehingga dapat menyebabkan toksistasitas pada saluran ekskresi sehingga pada beberapa senyawa yang memiliki nilai PPB>90% tidak dapat dijadikan sebagai kandidat obat baru seperti pada senyawa BLH5 memiliki nilai PPB>90% dengan keadaan *non mutagen* maka dari itu tidak dapat dilakukan analisis lebih lanjut karena akan bersifat toksik jika terikat kuat pada plasma. Tetapi pada senyawa BLH9, BLH18, BLH19 aspek farmakokinetik pada nilai PPB berada dibatas ambang toleransi >90% sehingga akan dilakukan penelitian lebih lanjut pada uji selanjutnya yang akan dijadikan sebagai kandidat obat baru terdapat 4 yaitu senyawa BLH9, BLH13, BLH18 dan BLH19.

Molecular Docking dan Visualisasi hasil Docking

Molecular docking dilakukan pada senyawa uji biji lada hitam terhadap reseptor 4RP9. Analisis *molecular docking* ini dilakukan pada aplikasi *PyRx 0.9.8* dengan memilih konformasi senyawa yang memiliki nilai *Free Energy Binding* (FEB) atau energi bebas (ΔG) dan nilai *Konstanta Inhibisi* (Ki) yang paling rendah (Juliana *et al.*, 2016). *Molecular docking* ini dilakukan untuk mengetahui konformasi interaksi senyawa uji pada sisi aktif reseptor protein target dan senyawa uji yang mempunyai pengikatan afinitas terbaik terhadap reseptor protein target (Pangastuti *et al.*, 2016). *Grid box* yang digunakan sama seperti tahap validasi *re-docking*, *grid* merupakan tempat terjadinya interaksi ligan dengan kantung aktif protein pada proses *docking*. *Number of point* yang digunakan pada *grid box* yaitu 40 x 40 x 40 *dimensions* dan center *gridbox* X = -4,133 Y = 44,996 Z = 52,136. Hasil simulasi *docking* dan visualisasi *docking* terdapat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil *Molecular docking* dan visualisasi *docking* terhadap reseptor 4RP9

No	Nama Senyawa	Binding Energi (Kkal/mol)	Ki (μM)	Interaksi dengan asam amino	
				Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrofobik
1	Asam Askorbat (Pembeding)	-6,49	17,36	Asp314, His135, His194, Tyr87	Gln139, Gln195, Phe362, Met410, Thr86, Ile358, Ile136
2	BLH9	-6,74	11,45	Asp314, His135	Leu55, Phe52, Phe362, Tyr87, Met410, His194, Ala316, Gln56, Ser59, Ile358, Thr63, Ile136
3	BLH13	-6,22	27,63	His194, Ala316	Thr17, Gln56, Ser59, Gly60, Thr63, Thr86, Gln139, Gln195, Ile136, Leu55, His135, Ile358, Tyr87, Asp314, Met410
4	BLH18	-7,73	2,15	-	Gly60, Ser59, Thr63, Lys67, Thr86, Gln139, Gln195, Ile136, met410, Gln56, Asp314, Phe52, Leu55, Tyr87, His194, Ile358, Phe362, Ala19, His135

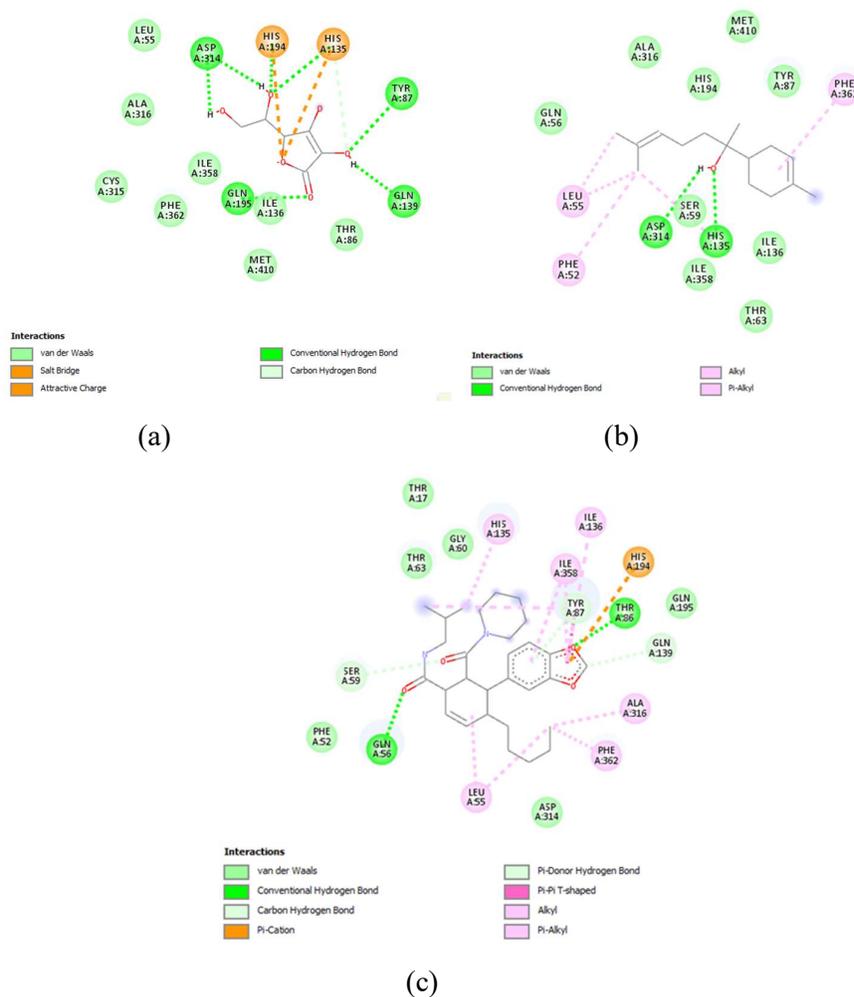
5	BLH19	-7,93	1,54	Thr86, Ser59, Gln139, Tyr87	Gln86, Asp314, Gln139, Tyr87	Gly60, Lys67, Gln195, Ile136, Met410, Gln56, Asp314, Phe52, Ileu55, Tyr87, His194, Ile358, Phe362	Ser59, Thr63, Thr86, Gln139, Gln195, Ile136, Met410, Gln56, Asp314, Phe52, Ileu55, Tyr87, His194, Ile358, Phe362
---	-------	-------	------	-----------------------------------	------------------------------------	--	---

Ket: - μ M = mikromolar

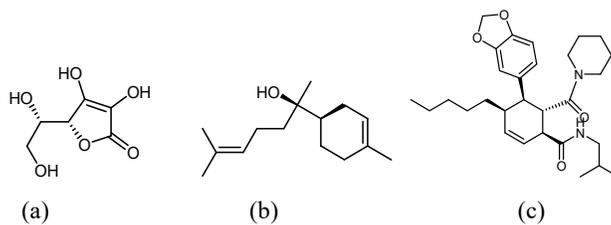
= asam amino yang sama

Berdasarkan Tabel 3. Hasil molekular *docking* senyawa uji terhadap reseptor 4RP9 diperoleh empat senyawa yang memiliki nilai *Free Energy Binding* (FEB) atau energi bebas *Gibbs* (ΔG) dan nilai K_i yang paling rendah yaitu senyawa BLH19, BLH18, BLH9 dan BLH13. Senyawa uji tersebut memiliki interaksi yang stabil juga baik terhadap reseptor 4RP9 karena semakin negatif nilai FEB maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin stabil. Senyawa obat pembanding yaitu asam askorbat diperoleh nilai FEB tinggi atau dikatakan tidak stabil dibandingkan dengan senyawa uji sehingga dari senyawa uji biji lada hitam yaitu senyawa BLH19, BLH18, BLH9 dan BLH13 dapat dijadikan sebagai kandidat antioksidan dan dilakukan analisis lebih lanjut berupa visualisasi hasil *docking*.

Pada Tabel 3, asam amino yang membentuk ikatan hidrogen terdapat pada obat pembanding, BLH9, BLH13 dan BLH19 pada hasil *molecular docking*, tetapi pada senyawa BLH18 tidak membentuk adanya ikatan hidrogen sehingga tidak dapat dijadikan sebagai kandidat untuk dilanjutkan dalam proses *Molecular Dynamic*. Pada obat pembanding membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino Asp314, Gln139, His135, Gln195, His194, Tyr87. Pada senyawa BLH19 membentuk tiga ikatan hidrogen yang sama dengan asam askorbat dengan residu asam amino Asp314, Gln139, Tyr87, kemudian senyawa BLH9 membentuk 2 ikatan hidrogen dengan asam amino Asp314, His135. Maka dapat dianalisis dari hasil visualisasi senyawa uji berikatan dengan sisi aktif distabilkan oleh interaksi asam amino Tyr87, Asp314, Gln139 dan His135 karena memiliki interaksi yang stabil dengan senyawa tersebut, sehingga dari persamaan interaksi residu asam amino, senyawa BLH9 dan BLH19 dengan asam askorbat dapat diprediksi bahwa kedua senyawa uji memiliki aktivitas yang sama (Koropatkin *et al.*, 2005). Gambar 6 menunjukkan visualisasi interaksi ligan terhadap reseptor 4RP9 dan Gambar 7 merupakan struktur dengan *virtual screening* terbaik.



Gambar 6. Hasil visualisasi interaksi ligan terhadap reseptor 4RP9 Asam askorbat (a), BLH9 (b),BLH19 (c)



Gambar 7. Struktur senyawa dengan virtual screening terbaik.

Obat pembanding: Asam askorbat (a), senyawa BLH9: *alpha-Bisabolol* (b), senyawa BLH19: *Nigramide K* (c)

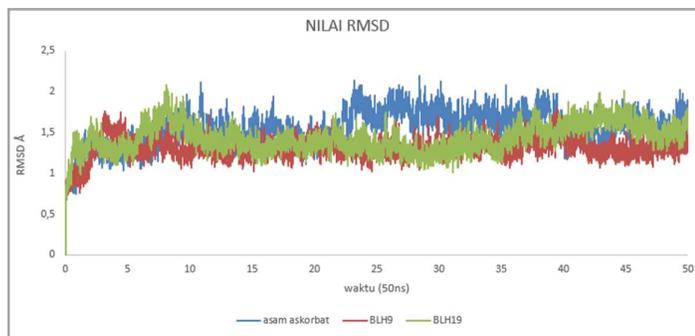
Simulasi Dinamika Molekular

Simulasi Dinamika Molekular diperoleh dua kandidat senyawa terpilih yaitu BLH9, BLH19 dan obat pembanding (asam askorbat) untuk dilakukan *molecular dynamic* dengan waktu 50 ns. Senyawa terpilih tersebut dipilih karena tidak bersifat toksisitas, nilai *binding*

energy dan Ki terkecil serta interaksi ikatan hidrogen yang terjadi dibandingkan dengan obat pembanding serta berdasarkan parameter farmakokinetik, toksisitas. Molekular Dinamik menghasilkan 3 nilai aspek *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) dan *Molecular Mechanics – Generalized Born Surface Area* (MMGBSA) (Mardianingrum *et al.*, 2021).

1. RMSD (*Root Mean Square Deviasi*)

RMSD digunakan untuk melihat pergeseran atau perubahan konformasi molekul.



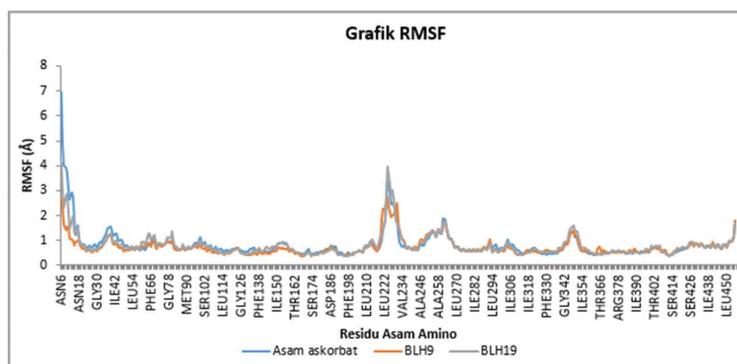
Gambar 8. Nilai RMSD obat pembanding (Asam askorbat), senyawa BLH9 dan senyawa BLH19.

Hasil nilai RMSD pada BLH9 terhadap reseptor menunjukkan kestabilan pada waktu 40 ns dengan nilai RMSD 1,2 Å, BLH19 terhadap reseptor mencapai kestabilan pada waktu 27 ns dengan nilai RMSD 1,5 Å, pada senyawa asam askorbat (pembanding) terhadap reseptor mencapai kestabilan pada waktu 30 ns dengan nilai RMSD 1,6 Å. Nilai RMSD dapat dikatakan stabil dengan tidak adanya fluktuasi yang tidak terlalu tinggi hingga 0,1 nm yang menunjukkan stabilitas protein karena dapat mempertahankan tempat pengikatan dengan ligan. Berdasarkan hasil analisis RMSD senyawa yang memiliki kestabilan yaitu senyawa BLH9 karena nilai RMSD lebih rendah dan grafik yang menunjukkan kestabilan yang baik dibandingkan dengan asam askorbat dan senyawa BLH19.

2. RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*)

Root Mean Square Fluctuation (RMSF) ini merupakan keadaan fluktuasi residu asam amino penyusun reseptor yang terjadi selama proses simulasi berlangsung. Nilai RMSF yang memiliki residu fluktuasi rendah menunjukkan bahwa residu tersebut memberikan fleksibilitas baik dan memiliki interaksi atau ikatan stabil dan berperan aktif pada situs pengikatan ligan reseptor, sedangkan residu dengan fluktuasi tinggi menunjukkan bahwa residu tersebut memberikan fleksibilitas tidak baik dan dikatakan memiliki interaksi atau ikatan yang tidak stabil karena mengalami banyak perubahan posisi saat proses simulasi berlangsung, sehingga dapat dikatakan bahwa residu tersebut tidak berperan aktif pada situs

pengikatan ligan – reseptor (Dermawan *et al.*, 2019). Hasil analisis RMSF dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik nilai RMSF dari Asam askorbat, BLH9 dan BLH19.

Berdasarkan hasil analisis RMSF Gambar 9 dapat dilihat fluktuasi dari senyawa obat pembandingan, senyawa BLH9 dan senyawa BLH19 memperlihatkan pergerakan fruktiasi yang hampir sama. Adanya peningkatan fruktiasi pada residu asam amino reseptor 4RP9 dengan senyawa BLH9, senyawa BLH19 dan obat pembandingan Asam askorbat, pada senyawa BLH19 memiliki fruktiasi yang tinggi pada asam amino Gly224 sehingga asam amino tersebut bukan sebagai sisi aktif karena residu dengan fluktuasi tinggi dikatakan memiliki interaksi atau ikatan yang tidak stabil karena mengalami banyak perubahan posisi saat proses simulasi berlangsung. Fluktuasi yang baik ditunjukkan dengan fruktiasi yang lebih rendah yaitu pada residu Gln139 dan Asp412 karena mempunyai ikatan yang lebih baik, sehingga dikatakan bahwa residu dengan fluktuasi rendah menunjukkan bahwa residu tersebut tidak memberikan fleksibilitas yang tinggi dan dapat dikatakan memiliki interaksi atau ikatan yang stabil dan berperan aktif pada situs pengikatan ligan dan reseptor (Dermawan *et al.*, 2019).

3. *Molecular Mechanics – Generalized Born Surface Area (MM-GBSA)*

Pada metode kalkulasi MM-GBSA ini menghasilkan energi bebas (ΔG) yang menunjukkan afinitas senyawa untuk berikatan dengan reseptor. Semakin kecil nilai energi bebas (ΔG) maka semakin besar kemampuan suatu senyawa untuk berikatan dengan reseptor (Genheden., 2015). Hasil dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil kalkulasi energi bebas ikatan sistem ligan-reseptor.

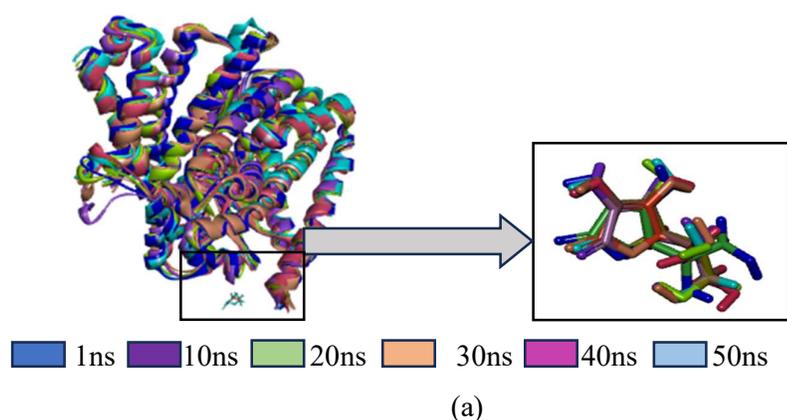
Komponen Energi (kkal/mol)	Asam Askorbat	BLH9	BLH19
Interaksi Van der Waals (VdW)	-5,14	-14,66	-37,36
Energi Elektrostatik (EEL)	-242,20	-103,24	-54,22

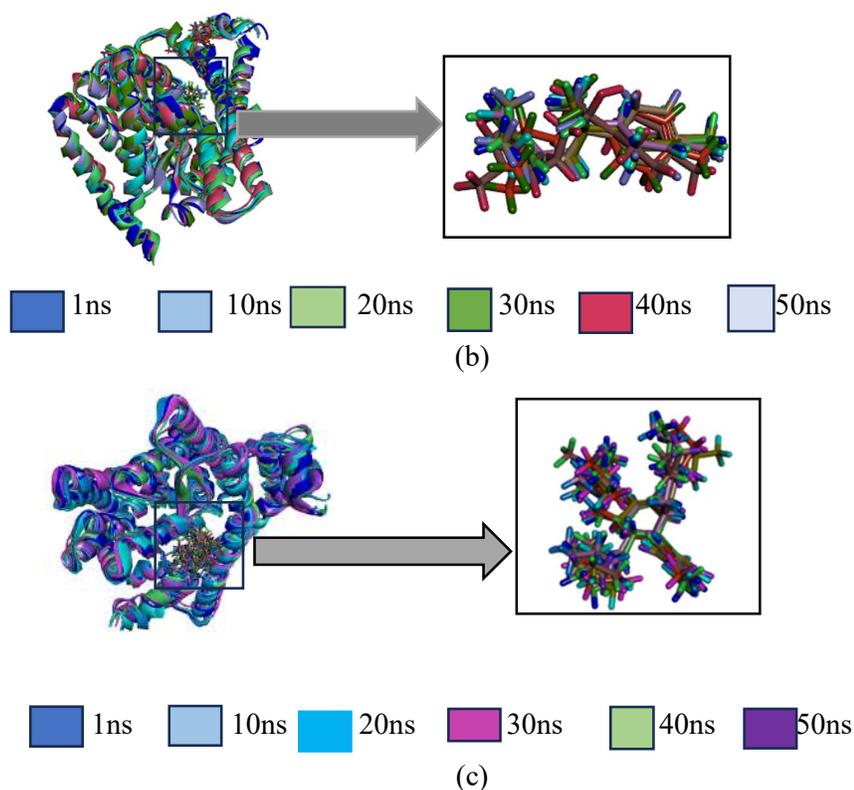
Komponen Energi (kkal/mol)	Asam Askorbat	BLH9	BLH19
Kontribusi Elektrostatik terhadap Energi Bebas Solvasi (EGB)	245,32	114,81	62,96
Kontribusi Non-polar terhadap Energi Bebas Solvasi (ESURF)	-1,36	-2,09	-4,87
ΔG_{gas} (VdW+EEL)	-247,35	-117,90	-91,59
ΔG_{solv} (EGB + ESURF)	243,96	112,72	58,08
ΔG_{TOTAL} (VdW + EEL + EGB + ESURF)	-3,39	-5,17	-33,50

Berdasarkan Tabel 4. Hasil menunjukkan bahwa energi bebas ikatan total (VdW + EEL + EGB + ESURF) pada obat perbandingan (Asam askorbat) yaitu -3,39 Kkal/mol, pada senyawa BLH9 yaitu -5,17 Kkal/mol dan senyawa BLH19 yaitu -33,50 Kkal/mol. Sehingga senyawa BLH19 diharapkan dapat menghasilkan kestabilan yang baik terhadap reseptor 4RP9 karena memiliki nilai lebih rendah dibanding asam askorbat dan senyawa BLH9 sehingga dikatakan memiliki ikatan untuk dijadikan suatu kandidat obat baru antioksidan secara *in silico*.

Visualisasi Hasil Analisis *Molecular Dynamic*.

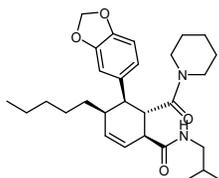
Visualisasi ini dilakukan untuk melihat perubahan konformasi ligan reseptor selama proses simulasi dinamika molekul untuk sistem ligan dan reseptor yang memiliki tingkat kestabilan yang lebih baik sehingga perlu dilakukan analisis untuk jenis interaksi ligan protein dalam waktu simulasi 50000 ns. Perubahan konformasi hasil simulasi dinamika molekul dapat dilihat pada Gambar 10.





Gambar 10. *Superimposition* hasil simulasi dinamika molekuler dari kompleks Asam askorbat (a), senyawa BLH9 (b), senyawa BLH19 (c).

Interaksi senyawa BLH9 terhadap reseptor tidak terbentuknya ikatan hidrogen selama proses simulasi berlangsung. Namun berbeda pada interaksi senyawa BLH19 terhadap reseptor 4RP9 yang dapat membentuk ikatan hidrogen pada waktu simulasi 10000 ps. Pada waktu 10000 ps senyawa berinteraksi dengan residu asam amino membentuk ikatan hidrogen yaitu **Gln139**. Interaksi dengan **Gln139** yang ditemukan pada simulasi. Hal ini menunjukkan bahwa residu asam amino tersebut merupakan residu yang dapat membangun sistem kompleks 4RP9 sehingga senyawa tersebut dapat dijadikan sebagai kandidat antioksidan. Struktur senyawa BLH19 (*Nigramide K*) dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar. 11 Struktur senyawa BLH19 (*Nigramide K*) yang dijadikan kandidat obat baru secara *in silico*

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Senyawa yang terkandung dalam biji lada hitam (*Piper nigrum L.*) yang telah memenuhi uji toksisitas dan uji farmakokinetik terdapat 4, dimana 2 diantaranya yaitu senyawa BLH9 (*alpha-Bisabolol*) dan senyawa BLH19 (*Nigramide K*) yang dijadikan sebagai kandidat obat baru secara *in silico* memiliki nilai *Protein Plasma Binding* berada dibatas nilai toleransi sehingga jika dibandingkan dengan obat pembanding (asam askorbat), senyawa BLH19 dan senyawa BLH9 memiliki nilai aktifitas FEB dan ikatan hidrogen yang lebih baik.
2. Interaksi hidrogen yang terjadi pada senyawa biji lada hitam (*Piper nigrum L.*) terdapat pada residu asam amino Gln139 karena ikatan sisi aktif distabilkan oleh asam amino Gln139 sehingga dapat diprediksi bahwa residu Gln139 memiliki interaksi yang stabil dengan senyawa uji lainnya dan senyawa BLH19 tersebut memiliki aktivitas biologis yang sama dengan obat pembanding (asam askorbat) karena berikatan dengan residu asam amino yang sama yaitu Gln139.
3. Berdasarkan hasil dari simulasi dinamika molekular diketahui senyawa BLH19 (*Nigramide K*) memiliki interaksi hidrogen paling stabil dibandingkan dengan obat pembanding (Asam askorbat) terhadap reseptor 4RP9 dengan nilai FEB -7,93 kkal/mol.

Saran

1. Diperlukan modifikasi struktur senyawa lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa baru dengan meningkatkan aktivitas, meningkatkan selektivitas obat dan toksisitas atau efek samping yang lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Aghnia Salsabila, H., Author, C., Studi Pendidikan Dokter, P., Kedokteran, F., & Lampung, U. (2021). Efektivitas Ekstrak Lada Hitam (*Piper Nigrum L.*) Dan Zink (Zn) Terhadap Viabilitas Dan Morfologi Sperma. *Jurnal Medika Utama*, 3(01): 1507-1511.
- Alaris D, D., Ricky J., Fitriyani., Adang., Wiwin W. (2020). Peningkatan Kelarutan Ekstrak Lada (*Piper Nigrum L.*) Dalam Air Dan Karakterisasinya. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia*, 9(1) : 61-74.
- Budilaksono, W., Wahdaningsih, S., Fahrurroji, A., & Studi Farmasi, P. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksanakulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Lemairei Britton Dan Rose*) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 1(1): 1-11.

- Dermawan, D., Sumirtanurdin, R., & Dewantisari, D. (2019). Molecular Dynamics Simulation Estrogen Receptor Alpha againsts Andrographolide as Anti Breast Cancer. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6(2): 65-76.
- Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. In *Molecules*, 20(7) : 13384–13421).
- Guan, L., Yang, H., Cai, Y., Sun, L., Di, P., Li, W., Liu, G., & Tang, Y. (2019). ADMET-score-a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *MedChemComm*, 10(1) : 148–157.
- Irwan I . (2021). Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian, L., & Tropis, F. *Journal homepage.*, 92–98.
- Juliana, K., Amin, M., & Suarsini, E. (2016). Analisis Virtual Screening Senyawa Alami Anti Aging Kandidat Inhibitor Komplek Protein Mmp1. *Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek*, 114-125
- Karsiwan., Lisa Retno., & Tusriyanto. (2022). Jejak Perkembangan Lada Masa Kesultanan Banten di Lampung th 1662-1772. *Candrasangkala: Jurnal Pendidikan dan Sejarah*, 8 (2):50-62
- Kesuma, D., Siswandono, S., Purwanto, B. T., & Hardjono, S. (2018). Uji in silico Aktivitas Sitotoksik dan Toksisitas Senyawa Turunan N-(Benzoil)-N'-feniltiourea Sebagai Calon Obat Antikanker. *JPSCR : Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 3(1): 1-11.
- Kurniasih, N., Kusmiyati, M., Nurhasanah., Puspita Sari, R., Wafdan, R. (2015). Potensi Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn), Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis), Dan Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe Pentandra*) Sebagai Antioksidan Pencegah Kanker. *Jurnal Istek*, 9(1) : 162-184.
- Labagu, R., Asri, Naiu, S., Yusuf, N., Teknologi, J., Perikanan, H., Perikanan, F., & Kelautan, I. (2022). Kadar Saponin Ekstrak Buah Mangrove (*Sonneratia Alba*) Dan Daya Hambatnya Terhadap Radikal Bebas DPPH Levels Of Saponin In Mangrove Fruit (*Sonneratia Alba*) Extract And Its Inhibition Against Dpph Free Radical. *Jambura Fish Processing Journal*, 4(1): 1–11.
- Luo, P., Yu, X., Wang, W., Fan, S., Li, X., & Wang, J. (2015). Crystal structure of a phosphorylation-coupled vitamin C transporter. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(3), 238–241.
- Mardianingrum, R., Bachtiar, K. R., Susanti, S., Aas Nuraisah, A. N., & Ruswanto, R. (2021). Studi In Silico Senyawa 1,4-Naphthalenedione-2-Ethyl-3-Hydroxy sebagai Antiinflamasi dan Antikanker Payudara. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 17(1), 83–95.
- Mighra, B. A., & Djaali, W. (2019). Peningkatan Pengetahuan Lansia tentang Penyakit Degeneratif di Wilayah Kampung Tengah KramatJati. *Jurnal Pemberdayaan Komunitas MH Thamrin*, 1(2): 49-55.
- Muttaqin, F. Z., Ferdian Pratama, M., Kurniawan, F., Tinggi, S., & Bandunng, F. (2019). Molecular Docking And Molecular Dynamic Studies Of Stilbene Derivative Compounds As Sirtuin-3 (Sirt3) Histone Deacetylase Inhibitor On Melanoma Skin Cancer And Their Toxicities Prediction In Molecular Docking. *Journal of Pharmacopolium* 2 (2) :119-121.

- Pangastuti, A., & Amin, M. (2016). *Prosiding Seminar Nasional II Tahun* (Vol. 26).
- Pendidikan Biologi, P., & Wijaya Kusuma Surabaya, U. (2018). Seminar Nasional VI Pengembangan tehnik Docking Molekuler untuk meningkatkan pemahaman kerja enzim dalam pembelajaran biokimia. *Seminar nasional VI Prodi Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Malang*, 8(1): 201-206.
- Rahmadi, A., & Yusuf, B. (2018). *Book Pangan Fungsional Berkhasiat Antioksidan*. Universitas Mulawarman Samarinda. : 1-216.
- Ruswanto, R., Mardhiah, M., Mardianingrum, R., & Novitriani, K. (2015). Sintesis dan Studi In Silico Senyawa 3-Nitro-N'-[(Pyridin-4-Yl) Carbonyl]Benzohydrazide Sebagai Kandidat Antituberkulosis. *Chimica et Natura Acta*, 3(2): 54-61.
- Qurrota A'yuna, A., Annisaa', E., & Dianingati, R. S. (2022). Hubungan Tingkat Pengetahuan Terhadap Perilaku Penggunaan Suplemen Vitamin C Pada Masyarakat Saat Pandemi Covid-19: Di Daerah Kecamatan Lamongan Kabupaten Lamongan. *Generics : Journal of Research in Pharmacy*, 2(2) : 93-98.
- Sartika, D. M., Malaha, N., Sima, Y., & Amanah Makassar Abstrak, S. (2023). Upaya Penguatan Kualitas Kesehatan Dalam Pencegahan Penyakit Degeneratif. *Sahabat Sosial Jurnal Pengabdian Masyarakat*, 1(2): 1-6.
- Siagian, D. D., Kepel, B. J., Manampiring, A., Bodhi, W., & Budiarmo, F. D. (2022). Analisis Antioksidan Senyawa Bioaktif Ekstrak Lidah Buaya Secara In silico. *E Biomedik*, 10(2): 129–135.
- Wibawa, J. C., Wati, L. H., & Arifin, M. Z. (2020). Mekanisme Vitamin C Menurunkan Stres Oksidatif Setelah Aktivitas Fisik. *JOSSAE : Journal of Sport Science and Education*, 5(1): 57-63.
- Zulfa, A., Anggun, L., & Murhayati hasriyani, R. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Biji Lada Hitam (Piper Nigrum L) Terhadap Bakteri Escherichia Coli. In *Indonesia Jurnal Farmasi*, 5(2): 14-18.