

## Uji Potensi Antioksidan Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*) dengan Pendekatan *In Vitro* dan *In Silico*

Dian Novita W, Silvy Amalia Falyani

**Corresponding author:**

[diannovi@unisma.ac.id](mailto:diannovi@unisma.ac.id)

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Malang

**DOI:**

<http://dx.doi.org/10.33474/jki.v10i2.13823>

**History Article**

Received: 2021-08-10

Reviewed: 2021-09-01

Accepted: 2021-10-10

Published: 2021-11-10

**Keywords:**

*Orthosiphon aristatus*;

*eupatorine*; *rosmarinic acid*;

*sinensetin*; *in vitro*; *in silico*

**Abstract:** *Orthosiphon aristatus* is a potential herb as a source of antioxidants. It is known from previous research, that the active compounds *O.aristatus* include eupatorin, rosmarinic acid and sinensetin. The study of the potential approach of active compounds extracts *O.aristatus* with the *in vitro* methods DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) and *in silico* using the help of pyrex autodock vina software, with the help of visualization using biovia discovery studio and pymol. Results obtained from *in vitro* tests using DPPH showed the presence of antioxidant activity with yellow spotting markers against a purple background. Studies *in silico* show that *O.aristatus* extract is potentially an antioxidant compound, this is demonstrated through the presence of ligand bonds with glutathione peroxidase (GPX) receptors namely van der Waals bonds, hydrogen bonds and several other bonds.

*Orthosiphon aristatus* (kumis kucing) merupakan tanaman obat yang bernilai tinggi, tumbuh dengan baik di Asia Tenggara. *O. aristatus* mengandung flavonoid lipofilik (sinensetin dan isosinensetin), katekol glikosida, asam rosmarinic, kafein, fitosterol, predensin, paclitaxel, tanin, dan minyak atsiri (pimaran, sisopimaran) terpen eter tetrametil eter tetrahidrofuran eter A) dan senyawa Orthosifol A-E (Mun'im, 2011).

Radikal bebas memainkan peran penting dalam metabolisme aerobik. Organisme aerobik biasanya terus menerus menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) sebagai produk sampingan dari metabolisme aerobik, yang dapat berperan dalam beberapa proses alami dalam tubuh. Turunan oksigen ini dinetralkan dalam keadaan normal oleh enzim sistem pertahanan antioksidan (superoksida dismutase, katalase, glutathione peroxidase) dan antioksidan non-enzimatik (vitamin C, vitamin E, *glutathione*). Senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk

mencegah radikal bebas dan menstabilkan ROS dengan cara mengikat elektron ROS bebas sehingga dapat menetralkan spesies oksigen menjadi bentuk yang stabil dan dapat menunda, mencegah atau menghilangkan kerusakan oksidatif pada molekul target, misalnya protein, lipid, dan DNA. akibat radikal bebas (Muyassar dan Retnoningrum, 2019).

Pada studi pendahuluan ini, peneliti ingin mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak *O.aristatus* dengan menggunakan metode *in vitro* DPPH dan *in silico* menggunakan reseptor glutathione peroxidase (GPX).

**METODE**

Adapun tahapan penelitian adalah: ekstraksi maserasi daun kumis kucing dengan pelarut methanol, skrining fitokimia, dan uji penghambatan radikal bebas secara *in vitro* menggunakan DPPH dan *in silico*.

### **Ekstraksi**

Langkah ekstraksi dengan metode mase-rasi, yang pertama daun kumis kucing ditim-bang menggunakan neraca digital sebanyak 100 gr dan di campurkan dengan pelarut methanol sebanyak 1000 ml untuk direndam di dalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan alumu-nium foil dan dimasukkan dalam shaker water bath dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu hasil ekstrak disaring dengan vacuum buchner dan di evaporasi pada suhu 40°C. Selanjutnya ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C.

### **Uji Penghambatan Radikal Bebas secara *In Vitro* dengan DPPH**

Uji penghambatan Radikal Bebas meng-gunakan eluen larutan BAA (butanol:asam ase-tat glasial:air) dengan perbandingan 3:1:1. Eks-trak sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 mL pelarut yang sesuai, lalu ditotolkan pada plat KLT (kromatografi lapis tipis) menggunakan pipa kapiler, dan dimasukkan ke dalam cham-ber yang berisi eluen yang telah dijenuhkan. Eluen dibiarkan merambat hingga mencapai batas plat KLT yang telah ditandai. Setelah terelusi, ditunggu hingga plat KLT kering kemu-dian disemprot dengan menggunakan larutan DPPH 0,1 mM dan dibiarkan selama 30 menit lalu diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif adanya aktivitas penghambatan radikal bebas ditandai dengan terbentuknya noda berwarna kuning pucat setelah disemprot dengan latar belakang ungu. Bercak noda di-amati dengan menggunakan sinar UV (ultravio-let).

### **Uji *In Silico* Interaksi Ligan Glutation Perok-sidase dengan Senyawa Aktif *Orthosiphon aristatus***

Bahan aktif dari ekstrak *O.aristatus* yang digunakan adalah eupatorin, asam rosmarinic dan sinensetin. Asam askorbat dan tocoferol berfungsi sebagai pembanding. Struktur 3D bahan aktif dan zat kontrol diunduh dari server Pub Chem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Struktur 3D masing-masing diunduh dalam for-mat sdf, protein reseptor GPX manusia diunduh dari (<http://www.uniprot.org/>). Urutan protein yang diperoleh dilakukan untuk pemodelan

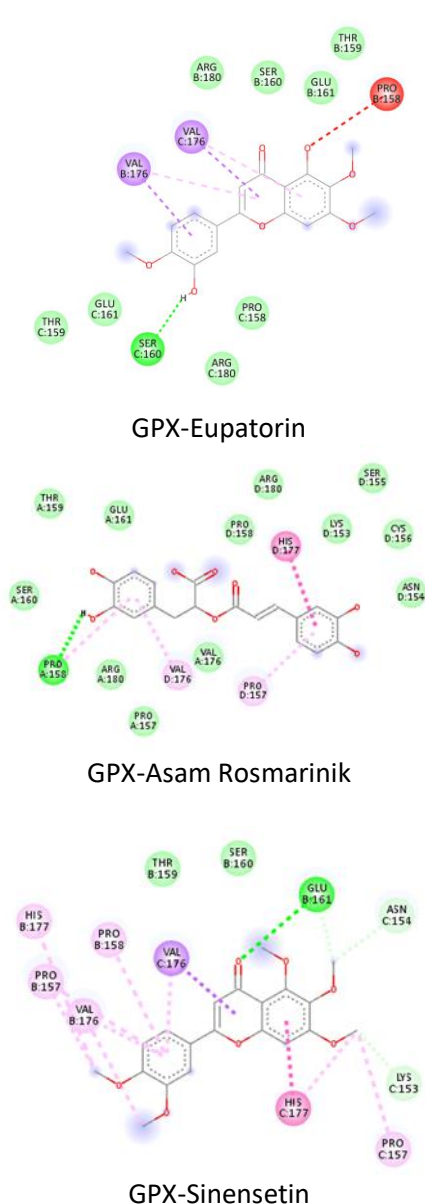
homologi makanan di <https://swissmodel.expasy.org/>. Protein yang diperoleh kemudian diunduh dan disimpan dalam format pdb.

Proses *docking* dilakukan dengan pro-gram Pyrx (*autodock vina*). Untuk melihat in-teraksi antara reseptor dan ligan menggunakan program *Biovia Discovery Studio*.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Uji *in vitro* ekstrak *O. aristatus* menggu-nakan DPPH untuk uji hambatan radikal bebas. DPPH merupakan oksidator yang dapat diguna-kan sebagai radikal bebas untuk menguji aktivi-tas antioksidan. Penerapan metode ini sederha-na, sederhana, sensitif, cepat dan membutuh-kan sampel yang kecil. (Sandhiutami, 2014). Pengujian *in vitro* dilakukan dengan cara penyemprotan ekstrak dengan reagen DPPH, hasil positif menunjukkan bercak kuning de-ngan latar belakang ungu (Banu, 2014). Hasil penelitian menunjukkan noda berwarna kuning yang muncul setelah penyemprotan reagen DPPH dengan latar belakang ungu. DPPH adalah radikal bebas yang stabil dan digunakan untuk mengevaluasi radikal bebas pada bahan alam. Metode ini mempunyai prinsip bahwa DPPH akan tereduksi oleh donasi hidrogen atau elek-tron sehingga warna berubah dari violet ke kuning dengan perubahan intensitas warna yang sebanding dengan jumlah donasi elektron yang diikuti dengan penurunan absorbansi (Sinala, 2019).

Nilai Rf ekstrak *O.aristatus* adalah 0,86. Kisaran Rf antara 0.85-0.87 dianggap flavonoid, karena tampak berwarna hijau dan mengelu-arkan fluoresensi kuning setelah hidrolisis, dan senyawa yang diduga adalah flavonol. Flavoi-noid berperan sebagai antioksidan dan melin-dungi tubuh terhadap ROS. Flavonoid dioksidasi oleh radikal, sehingga menjadi radikal yang lebih stabil dan non-reaktif (Arifin, 2018).



Gambar 1 Visualisasi interaksi ligan senyawa aktif dengan protein reseptor

Tabel 1 Analisis interaksi ligan senyawa aktif *O. aristatus* dengan glutathione peroxidase

Ligan ID	Reseptor	Interaksi
Asam askorbat*	GPX	Ikatan hidrogen: Asn 102, Gln 107, Tyr 72, Arg 123, Pro 109, Lys 137
		Ikatan Van der Waals: Gly 110, Glu 111, Lys 106, Cys 72
Tocoferol*	GPX	Ikatan hidrogen : His 177
		Ikatan Van der Waals: Glu 161, Asn 154, Glu 161, Ser 160, Pro 158, Pro 157, Arg 180
Eupatorin	GPX	Ikatan hidrogen : Ser 160 Ikatan Van der Waals: Glu 161, Pro 158, Arg 180, Thr 159, Arg 180, Ser 160, Glu 161, Thr 159

Asam rosmarinik	GPX	Ikatan hidrogen : Pro 158
		Ikatan Van der Waals: Ser 160, Thr 159, Glu 161, Pro 158, Arg 180, Lys 153, Ser 155, Cys 156, Asn 154, Arg 180, Pro 157, Val 176
Sinensetin	GPX	Ikatan hidrogen: Glu 161
		Ikatan Van der Waals : Thr 159, Ser 160, Asn 154, Lys 153

Keterangan: Bold dan underline menunjukkan adanya kompleks (GPX-ligan) mempunyai interaksi yang sama dengan standardnya. \*kontrol

Berdasarkan hasil *docking*, ikatan yang muncul antara ligan dan reseptor GPX diketahui adalah ikatan Van der Waals, ikatan hidrogen, dan berbagai ikatan lainnya. Pada Tabel 1. Senyawa eupatorin, asam rosmarinik, sinensetin menunjukkan ada interaksi dengan residu asam amino reseptor GPX. Ikatan yang terbentuk menandakan bahwa ligan uji dapat berikatan dengan asam amino yang ada pada reseptor GPX. Semakin banyak asam amino dari reseptor GPX yang terikat pada ligan maka ligan akan semakin stabil (Shofi, 2021). Bahan aktif *O. aristatus* mempunyai ikatan yang sama dengan pembanding yakni *tocoferol* pada protein Glu 161, Pro 158, Arg 180, dan Ser 160. Banyaknya asam amino residu hasil *docking* juga dapat menandakan kestabilan ligan uji, sehingga dapat memprediksi ligan tersebut cocok atau tidak sebagai kandidat obat (Rusmanto, 2015). Adanya ikatan hidrogen juga dapat menentukan posisi ikatan dari asam amino dari ligan hal ini dikarenakan ikatan hidrogen merupakan ikatan antara atom H yang mempunyai muatan positif dengan atom lain yang bersifat elektronegatif seperti O, N, dan F (Ruswanto, 2015). Interaksi dengan protein reseptor GPX dengan ikatan hidrogen menunjukkan bahwa ekstrak *O. aristatus* berpotensi sebagai antioksidan.

**KESIMPULAN**

Hasil pengujian *in vitro* dengan menggunakan DPPH terbukti bahwa *O.aristatus* mempunyai aktivitas antioksidan. Dalam pengujian *in silico* eupatorine, asam rosmarinik, dan sinensetin menunjukkan adanya aktivitas oksidan yang ditunjukkan pada banyaknya asam amino residu yang sama dengan pembanding yakni protein Glu 161, Pro 158, Arg 180, dan Ser 160 pada reseptor GPX.

#### DAFTAR RUJUKAN

- Arifin Bustanul, Sanusi Ibrahim. 2018. *Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid*. Jurnal Zarah, Vol. 6 No. 1 (2018), Halaman 21-29
- Banu, R.H.,Nagarajan, N. TLC and HPTLC Fingerprinting of Leaf Extracts of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merril. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014. 2(6).
- Mun;im A, Hanani E. 2011. *Fitoterapi Dasar*. Jakarta: Dian Rakyat
- Muyassar, A. M., & Retnoningrum, D. 2019. *Pengaruh Ekstrak Daun Kumis Kucing (Orthosiphon Aristatus) Terhadap Fungsi Hepar Tikus Wistar Yang Diinduksi Plumbum Asetat*. Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro), 8(2), 596–605
- Ramdhani Deni, Marjuki, Siti Chuzaemi. 2017. *Pengaruh perbedaan jenis pelarut dalam proses ekstraksi buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) pada pakan terhadap viabilitas protozoa dan produksi gas in-vitro*. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan 27 (2): 54 - 62
- Rusmanto. 2015. *Desain dan Studi Interaksi Senyawa N'-(3, 5-Dinitrobenzoyl) Isonicotinohydrazide Pada Mycobacterium tuberculosis Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (INHA)*. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*, 12(1), 192–201.
- Sandhiutami Ni Made, Lestari Rahayu. 2014. *Uji Toksisitas Akut, Aktivitas Antioksidan In Vitro dan Efek Rebusan Bunga Kemboja Merah (Plumeria rubra L.) terhadap Kadar Malondialdehid*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, April 2014, hlm. 43-49 ISSN 1693-1831
- Sinala Santi, Silsilia Tresia Rosmala Dewi. 2019. *Penentuan Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro Dari Ekstrak Etanol Propolis Dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)*. *Media Farmasi p.issn 0216-2083 e.issn 2622-0962* Vol. XV No. 1
- Shofi, M. 2021. *Studi In Silico Senyawa Kuarsetin Daun Kencana Ungu (Ruellia Tuberosa L.) Sebagai Agen Antikanker Payudara*. *Jurnal Sintesis*. Vol 2(1), pp: 1-9