

PREDIKSI INTERAKSI SENYAWA AKTIF BUNGA MARIGOLD *TAGETES ERECTA* L. DENGAN PROTEIN TUBUH DAN PENENTUAN PROSEDUR EKSTRAKSI

Rizki^{1*}, Navtalia¹, Naiffa Nurrahma Untsa¹, Rifki Arief Munandar², Diki¹

¹Program Studi Biologi, Universitas Terbuka, Tangerang, Banten, Indonesia

²Program Studi Teknik Informatika, Universitas Nusa Putra, Sukabumi, Jawa Barat, Indonesia

*Penulis Korespondensi : rizkiart3@gmail.com

ABSTRAK

Khasiat obat dari bunga Marigold (*Tagetes erecta* L.), bunga endemik Guatemala dan Mexico yang telah menyebar ke berbagai negara, termasuk Indonesia dengan memahami fitokimia senyawa aktif. Studi sebelumnya oleh Santi (2021) dan Ana dkk (2021) telah mengungkapkan senyawa aktif dalam bunga Gemitir, seperti Terpenoid, Atsiri, Fenol, Flavonoid, dan Karotenoid, tetapi belum memprediksi interaksi di dalam tubuh. Identifikasi interaksi senyawa aktif di dalam tubuh menggunakan SuperPred (SP) dan Swiss Target Prediction (STP) bertujuan untuk menunjukkan prediksi protein atau enzim tubuh yang berinteraksi dengan senyawa aktif sehingga berkhasiat sebagai obat tradisional. Pemahaman sifat senyawa aktif sebagai kimia obat dapat dijadikan pertimbangan dalam merinci metode ekstraksi yang optimal sesuai dengan khasiat yang diharapkan.

Kata Kunci : *Tagetes erecta* L.; Metode Ekstraksi; Senyawa aktif; Interaksi di Dalam Tubuh; Superpred dan Swiss Target Prediction.

1. PENDAHULUAN

Marigold telah dikenal di Indonesia sebagai tumbuhan yang memiliki fungsi sebagai salah satu bunga yang digunakan dalam upacara keagamaan, selain itu ada juga yang memanfaatkannya sebagai minuman teh berkhasiat. Bunga gemitir diyakini memiliki beragam khasiat.

Penelitian ini mengamati senyawa aktif dari bunga Marigold yg berinteraksi dgn protein di dalam tubuh. Senyawa aktif telah dirangkum oleh Ana, dkk. (2021) dan Santi (2021) dengan jumlah 57 senyawa, namun penelitian tersebut belum menjelaskan mekanisme dan kemungkinan interaksinya dengan protein di dalam tubuh manusia. Untuk mencari protein yang berinteraksi dengan senyawa aktif dilakukan prediksi dengan website yang telah dikembangkan yaitu Superpred (SP) (<https://prediction.charite.de/>) dan website Swiss Target Prediction (STP) <http://www.swisstargetprediction.ch/>.

Hasil prediksi dari kedua website adalah protein di dalam tubuh yang dapat berinteraksi dengan senyawa aktif. Kemudian dilakukan penelitian tentang fungsi fisiologis protein tersebut di dalam tubuh. Untuk mendapatkan senyawa aktif yang berkhasiat diperlukan proses ekstraksi yang sesuai. Maka, senyawa aktif tersebut akan diteliti sifat kimia dan fisiknya.

2. METODE

2.1. Konsep Peninjauan Ilmiah Khasiat Bunga Marigold

Terdapat dua metode dalam penelitian ini, yang pertama yaitu studi literatur dan yang kedua memprediksi protein target dengan website. Studi literatur dimulai dengan identifikasi senyawa

aktif pada bunga Marigold dan pencarian struktur SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System)-nya. Struktur SMILES digunakan untuk metode kedua yaitu prediksi struktur protein target di dalam tubuh manusia menggunakan web identifikasi SuperPred (SP) dan Swiss Target Prediction (STP). Protein target yang ditampilkan oleh web tersebut disortir menggunakan threshold diatas 80% pada parameter Probability dan/atau Accuracy Model. Protein target dianalisis kegunaannya di dalam tubuh kemudian dijadikan prediksi khasiat dari bunga Marigold.

2.2. Studi Literatur

Khasiat yang beredar di masyarakat Indonesia diidentifikasi dengan cara semua website mainstream yang membahas tentang *Tagetes erecta L.* ini dilakukan karena belum ada khasiat yang dipercaya masyarakat secara langsung tidak seperti tanaman obat keluarga, selain itu dicari juga jurnal penelitian yang berkaitan dengan bunga marigold. Selanjutnya mencari struktur Canonical SMILES di web NCBI (National Center For Biotechnology Information) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dan sciencedirect <https://sciencedirect.com/>.

Protein yang berpotensi berinteraksi dengan senyawa aktif tersebut didapatkan kemudian mencari fungsinya di website <https://www.uniprot.org/> dan penjelasannya sesuai jurnal yang telah dirangkum website tersebut. Jurnal tersebut dapat diakses di website NCBI sub bagian PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> atau di <https://europepmc.org/>. Selain itu struktur 2 dimensi (2D) dari senyawa aktif dan sifatnya dapat dicari di website NCBI dan <https://www.drugbank.com/>, sedangkan struktur 2D atau 3D dan sifat protein target dalam tubuh tersedia di website <https://www.rcsb.org/>.

2.3. Prediksi Protein Target dari Senyawa Bunga Marigold

2.3.1. Prediksi Protein menggunakan website Swiss Target Prediction (STP)

Cara kerja STP didasarkan pada pengamatan bahwa molekul bioaktif yang serupa cenderung memiliki target yang serupa, seperti dijelaskan dalam penelitian oleh (Keiser M.J dkk 2007) dan (Campillos M 2008). Target molekul diprediksi dengan mengidentifikasi protein-protein yang memiliki ligan yang sudah diketahui dan sangat mirip dengan molekul yang akan diprediksi. Pendekatan awal pada platform STP difokuskan pada penentuan kesamaan kimia menggunakan sidik jari molekuler (molecular fingerprints) atau kadang-kadang disebut kesamaan 2D, seperti yang dijelaskan oleh (Willett P 2011). Akurasi prediksi di platform ini ditingkatkan dengan menggabungkan kesamaan struktur 2D dan 3D. Dalam STP, baik nilai kesamaan 2D maupun 3D dihitung terhadap satu set ligan yang sudah diketahui. Untuk kesamaan 2D, digunakan sidik jari FP2 untuk menggambarkan molekul, seperti yang diimplementasikan dalam OpenBabel versi 2.2.0. Kesamaan antara dua molekul diukur dengan koefisien Tanimoto.

$$T(A, B) = \frac{(| A \cap B |)}{(| A \cup B |)}$$

(Jumlah pola sidik jari bersama yang sesuai dibagi oleh total jumlah pola sidik jari yang menggambarkan kedua molekul). Untuk kesamaan 3D, STP awalnya menghasilkan 20 konformasi berbeda dari setiap molekul. Dari konformasi berbeda ini, dihitung 20 vektor Elektrosape, yang terdiri dari vektor real 18 dimensi, sebagaimana ditunjukkan oleh (Armstrong M.S dkk 2011). Persamaan Manhattan distance digunakan untuk mengukur jarak antara vektor Elektrosape ini, memungkinkan penilaian kesamaan 3D antara molekul-molekul tersebut.

$$(d = \sum_{s=1}^{18} |x_s - y_s|)$$

Persamaan diatas digunakan untuk membandingkan vektor (x dan y) yang menggambarkan dua molekul yang berbeda. Nilai kesamaan 3D akhir antara molekul i dan j dihitung sebagai persamaan:

$$\frac{1}{(1 + \frac{1}{18} d_{ij})}$$

Dalam konteks ini, D_{ij} adalah jarak Manhattan terkecil di antara 20x20 jarak yang dihitung dari semua konformasi yang mungkin dari setiap molekul i dan j. Skor akhir dari suatu target sesuai dengan kombinasi ukuran kesamaan berdasarkan regresi logistik dari nilai kesamaan, dengan ligan-ligan paling mirip menggunakan ukuran kesamaan 2D dan 3D. Oleh karena itu, skor target berkisar antara 0 dan 1. Skor ini digunakan untuk meranking target yang diprediksi. Karena didasarkan pada validasi silang, hasil mungkin mengalami bias internal dalam data pelatihan STP. Jika menguji suatu molekul kueri baru yang tidak memiliki hubungan dalam basis data STP, hasil mungkin sedikit melebihi akurasi prediksi karena kecenderungan model untuk memahami pola dari data pelatihan sebelumnya.

2.3.2. Prediksi Protein menggunakan website SuperPred (SP)

Metode prediksi untuk drug–target yang digunakan SP mempertimbangkan kemiripan 2D antara senyawa kueri dan ligan yang terkait dengan targetnya masing-masing. Untuk setiap kumpulan target, penjumlahan semua koefisien Tanimoto di atas ambang batas 0,45 dianggap sebagai skor mentah. Untuk mencapai perbandingan antara skor mentah (raw score) dari kumpulan target yang kecil dan besar, skor mentah dinormalisasi dengan membaginya dengan jumlah ligan dari target yang bersangkutan. Untuk mengevaluasi spesifiktas prediksi lebih lanjut, Z-score dan E-value dihitung. Z-score dihitung dengan rumus:

$$Z_A = \frac{(\frac{raw\ score_A}{N_A} - \mu) \exp(0.335 \ln(N_A))}{\sigma}$$

di mana A adalah sebuah kumpulan target dan N_A mewakili jumlah ligan dari kumpulan target A. Seperti pada (Altschul,S.F dkk 1990), μ dan σ menggambarkan kebisingan (noise) latar belakang acak dari database. Nilai E menggambarkan jumlah target yang diprediksi yang dapat diharapkan muncul secara kebetulan, oleh karena itu hal ini bergantung pada ukuran dataset. Nilai E menurun secara eksponensial seiring dengan peningkatan Z-score dari prediksi. Semakin rendah nilai E, semakin signifikan prediksinya (Altschul,S.F dkk 1990). (Untuk detail dan rumus lebih lanjut, dapat dilihat pada bagian FAQ di situs web SuperPred).

Untuk kumpulan target yang beragam, Z-score cenderung berperilaku seperti skor acak tinggi (like high random scores). Oleh karena itu, diperkenalkan faktor bobot λ_A yang menunjukkan kemiripan rata-rata antara ligan dalam setiap kumpulan target:

$$\lambda_A = \exp(0.335 \ln(\frac{rawscore_{AA}}{N_{AA}}))$$

Faktor bobot bervariasi mulai dari hampir satu untuk kumpulan target yang sangat seragam hingga lebih dari sepuluh untuk kumpulan target yang sangat beragam. Dalam konteks ini, faktor bobot mencerminkan seberapa mirip ligan-ligan dalam setiap kumpulan target. Semakin tinggi faktor bobot, semakin beragam dan kompleks kumpulan target, sedangkan nilai yang lebih rendah menunjukkan kumpulan target yang lebih seragam. Dengan kata lain, faktor bobot memberikan informasi tentang tingkat variasi dalam sifat-sifat kimia antara ligan-ligan dalam suatu kumpulan target. Hasil prediksi target kemudian diurutkan berdasarkan Z-score yang telah diberi bobot, sehingga memberikan perhatian lebih pada prediksi yang relevan untuk kumpulan target yang lebih kompleks.

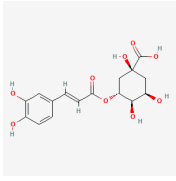
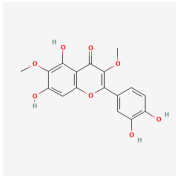
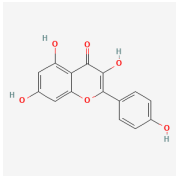
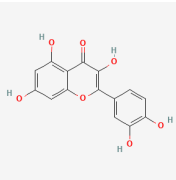
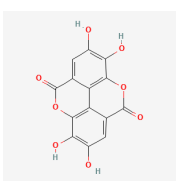
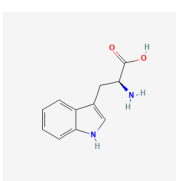
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

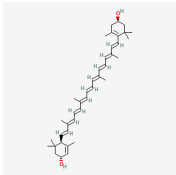
3.1. Senyawa Aktif pada Bunga *Tagetes erecta* L

Proses analisis senyawa aktif dengan cara mengekstrak seluruh senyawa yang ada di dalam bunga *Tagetes erecta* L. dengan solvent methanol, kemudian hasil ekstrak dianalisis menggunakan instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan sampel telah melewati kromatografi kolom dengan beberapa fraksi untuk keperluan isolasi sampel (Ana dkk, 2021) (Tabel 1).

Tabel 1. Senyawa Aktif *Tagetes erecta*

National Center for Biotechnology Information (2023). Retrieved December 19, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=>

Nama Senyawa	Formula	Canonical SMILES	Struktur
Chlorogenic Acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	<chem>C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O</chem>	
Axillarin	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	<chem>COC1=C(C2=C(C=C1O)OC(=C(C2=O)OC)C3=CC(=C(C=C3)O)O)O</chem>	
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>	
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>	
Ellagic Acid	C ₁₄ H ₆ O ₈	<chem>C1=C2C3=C(C(=C1O)O)OC(=O)C4=CC(=C(C(=C43)OC2=O)O)O</chem>	
Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	<chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)CC(C(=O)O)N</chem>	

Lutein	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	<chem>CC1=C(C(CC(C1)O)(C)C)C=CC(=CC=CC(=CC=CC=C(C)C=CC=C(C)C=CC2C(=CC(CC2(C)C)O)C)C)C</chem>	
--------	--	--	---

3.2. Protein yang Diprediksi Berinteraksi dengan Senyawa Aktif

SP memprediksi bahwa senyawa aktif diatas berinteraksi di dalam tubuh dengan protein *Transcription intermediary factor 1-alpha* dengan id protein O15164. Selain itu, STP juga memprediksi bahwa dari Chlorogenic acid dan Ellagic acid berinteraksi dengan Aldo-keto reductase family 1 member B1 dengan id protein P15121 (Tabel 2).

Tabel 2. Protein yang Diprediksi Berinteraksi dengan Senyawa Aktif

Nama Senyawa Identitas	Kemungkinan Interaksi Menurut Prediksi			
	AKR1B1 (P15121)	Sumber	TRIM24 (O15164)	Sumber
Axillarin	100%	STP	N/A	N/A
Ellagic acid	100%	STP	90.27%	SP
Kaempferol	100%	STP	N/A	N/A
Nama Senyawa Identitas	Kemungkinan Interaksi Menurut Prediksi			
	AKR1B1 (P15121)	Sumber	TRIM24 (O15164)	Sumber
Quercetin	100%	STP	N/A	N/A
Chlorogenic acid	87,21%	STP	92.21%	SP
Lutein	N/A	N/A	86.80%	SP
Tryptophan	N/A	N/A	94.38%	SP

3.3. Fungsi Protein TRIM24 (O15164) dan AKR1B1 (P15121)

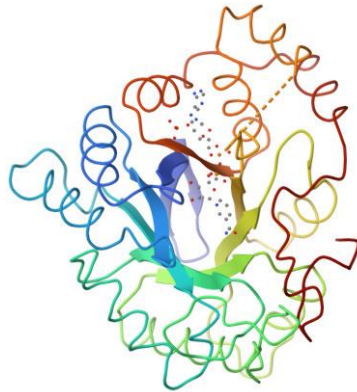


Gambar 1. Identitas Protein TIF1A (Database RCSB). Nama Protein : Transcription intermediary factor 1-alpha (TIF1A_HUMAN). ID Protein: O15164; Nama Gen: TRIM24 (<https://www.rcsb.org/structure/2YYN>)

TRIM24 (Transcription intermediary factor 1-alpha) berdasarkan lokasinya di dalam sel protein ini menurut (Zhu Q dkk 2020) terletak di Nukleus, Mitokondria sedangkan menurut (Wen-Wei 2010) terletak di sitoplasma sel secara umum protein ini adalah E3-Ubiquitin ligase maksudnya sebagai protein yang bertanggung jawab sebagai pengirim protein ubiquitin, ubiquitin sendiri adalah protein yang akan menandai protein lain yang akan didegradasi oleh proteasom.

TRIM24 sebagai regulatori enzim p53 yang berfungsi menjadi pengaturan dan penghentian enzim setelah kerusakan DNA teratasi. p53 perlu diregulasi untuk menghindari aktivitas yang berlebihan berujung kepada hentinya siklus sel hingga kematian sel. TRIM24 meregulasi p53 agar sel bisa kembali proliferasi. Penelitian untuk mengetahui fungsi TRIM24 ini menggunakan metode penelitian molekuler dengan kultur sel manusia dan tikus sebagai percobaan, diantaranya: MCF7, U2OS, dan HEK293T yang didapatkan dari ATCC. (Jain A.K., dkk, 2014). Pada penelitian lain disebutkan bahwa ubiquitinasi TRIM24 yang berada di mitokondria berikatan dengan protein TRAF3 menjadi TRAF3 yang termodifikasi. Modifikasi TRAF3 ini akan mengaktifkan sinyal antiviral karena berasosiasi dengan mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) dan TANK-binding kinase 1 (TBK1) kedua protein tersebut adalah protein yang meregulasi kekebalan tubuh terhadap virus RNA. Penelitian molekuler dilakukan dengan cara eksperimental ke sel hewan dan manusia terutama di sel MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts), TRAF3-KO (TRAF3 Knockout), HEK293T (Human Embryonic Kidney 293T) dan IRF3-KO (IRF3 Knockout). Hasilnya di analisis secara instrumen kompleks PCR (Zhu,Q., dkk, 2020).

Pada pasien endometriosis TRIM 24 berperan dalam menurunkan kadar pyroptosis yang ditandai dengan biomarker Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), caspase-1 (CASP1), dan interleukin-1beta (IL-1beta). Biomarker tersebut akan menurun ketika TRIM 24 ditambahkan kadarnya di dalam sel yang dikultur. Mekanisme nya TRIM 24 menghindari translokasi sel dan mengurangi inflamasi akibat kematian sel. Sehingga bisa dikatakan TRIM 24 mengurangi inflamasi di luar rahim akibat penambahan pyroptosis (Hang, Y., dkk, 2021).



Gambar 2. Identitas Protein ALDR (Database RCSB). Nama Protein: **Aldo-keto reductase family 1 member B1 (ALDR_HUMAN)**. ID Protein: **P15121**; Nama Gen: **AKR1B1** (<https://www.rcsb.org/structure/1ABN>)

Aldo-keto reductase family 1 member B1 merupakan suatu protein yang dapat berinteraksi dengan beberapa senyawa aktif. AKRB 1B1 banyak ditemukan di sitoplasma (Hamada, 1991). AKRB 1B1 ini secara umum merupakan protein yang dapat mengkatalisis reduksi NADP⁺ dan aldehyd fosfolipid.

Pada penderita diabetes terjadi kadar peningkatan sorbitol yang disebabkan oleh perbedaan aktivitas yang dilakukan oleh aldose reduktase, dimana enzim ini mengubah glukosa menjadi sorbitol. Sorbitol ini menyebabkan penyakit komplikasi jika terlalu banyak diproduksi oleh tubuh. Adanya AKRB 1B1 dapat membantu untuk mengkatalisis reduksi yang bergantung pada NADPH dari berbagai macam senyawa yang mengandung karbonil seperti aldose reduktase sehingga enzim ini dapat mereduksi glukosa yang mengubah sorbitol dalam takaran yang sesuai ketika terjadi hiperglikemia. Protein ini juga dapat menunjukkan aktivitas enzimatik terhadap metabolit endogen seperti aldehyda aromatik dan alifatik, keton, monosakarida, asam empedu dan substrat xenobiotik. (Hamada, 1991).

Penelitian yang dilakukan oleh Bernat, 2003, ditemukan bahwa selain AKR dapat menunjukkan aktivitas enzimatik terhadap metabolit endogen seperti aldehyda aromatik dan alifatik, keton, monosakarida, asam empedu dan substrat xenobiotik, AKR juga dapat mereduksi steroid yang terdapat dalam tubuh dan turunannya juga terhadap prostaglandin. Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa Bernat berhasil mereduksi reduktase retina bergantung NADP(H) sitosol pertama yang ada pada tubuh manusia. Adanya aktivitas enzimatik yang rendah terhadap all-trans-retinal, 9-cis-retinal, dan 13-cis-retinal. (Bernat, 2003). Begitu pula ketika mengkatalisis reduksi prostaglandin (PG) H(2), zat antara berbagai prostanoid, untuk membentuk PGF(2alpha) dengan adanya NADPH. AKR1B1, AKR1B3 dan AKR1B7 menunjukkan afinitas yang lebih tinggi terhadap PGH(2). Aktivitas sintase PGF(2alpha) dari AKR1B1 dan AKR1B3 secara efisien dihambat oleh dua inhibitor AKR, tolrestat dan sorbitol dalam cara non-kompetitif. (Zakayi, 2009).

Oksidasi fosfolipid menghasilkan beberapa aldehyd bioaktif yang tetap teresterifikasi menjadi aldehyd inti. Aldehyd ini menginduksi sel endotel untuk menghasilkan faktor kemotaktik monosit dan meningkatkan adhesi monosit-endotelium. Aldehyd ini juga berfungsi sebagai ligan reseptor yang mengambil lipoprotein teroksidasi atau sel apoptosis. Model fosfolipid aldehyd POVPC [1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-fosfokolin] direduksi secara efisien oleh anggota AKR 1, tetapi tidak oleh keluarga AKR 6 atau ARK7. AKR 1, aktivitas reduktase POVPC terbatas pada AKR1A dan B. Efisiensi katalitik Aldehyd reduktase usus kecil manusia (AKR1B10) sebanding dengan protein murine AKR1B 1B3 dan 1B8. Di antara protein murine AKR1A4 dan AKR1B7 menunjukkan aktivitas katalitik yang jauh lebih rendah

dibandingkan dengan 1B3 dan 1B8. AKR manusia, 1B1 dan 1B10, dan protein murine, 1B3 dan 1B8, juga mereduksi aldehida C7 dan C9 sn-2 serta POVPE [1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-fosfoetanolamina]. AKR1A4, B1, B7 dan B8 mengkatalisis reduksi aldehida yang dihasilkan dalam fosfatidilkolin C teroksidasi dengan ikatan asil, plasmenil atau alkil pada posisi sn-1 atau C fosfatidil glicerol atau asam fosfat idat. AKR1B1 menunjukkan aktivitas tertinggi dengan asam fosfatidat. Namun, AKR1A4 lebih efisien dengan aldehid rantai panjang seperti turunan 5-hidroksi-8-okso-6-oktanoil, sedangkan AKR1B8 lebih efektif pada fosfatidilgliserol. Hal ini menunjukkan bahwa AKR adalah reduktase fosfolipid aldehida yang efisien, dengan spesifisitas substrat yang tidak tumpang tindih, dan mungkin terlibat dalam metabolisme spesifik jaringan dari aldehida fosfolipid endogen atau makanan. (Spite, 2007)

Penelitian lain menunjukkan bahwa adanya aktivitas AKR1B1 dan 1B10 terhadap senyawa karbonil alfa, beta tak jenuh yang berasal dari seluler dan makanan, termasuk akrolein, crotonaldehide, 4-hydroxynonenal, trans-2-hexenal, dan trans-2,4-hexadienal. Hasil menunjukkan bahwa 1B10 memiliki aktivitas enzim yang jauh lebih baik terhadap bahan kimia ini dibandingkan 1B1. Dengan mendeteksi produk enzimatik menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi, menunjukkan bahwa 1B10 secara efisien mereduksi senyawa karbonil yang diuji pada tingkat fisiologis, namun 1B1 kurang efektif. 1B10 yang diekspresikan secara ektopik dalam sel 293T secara efektif menghilangkan 4-hidroksi nonenal dan direduksi menjadi 1,4-dihidroksi nonena, namun, tidak ada reaksi yang dihasilkan oleh 1B1 yang diekspresikan secara endogen. 1B1 dan 1B10 keduanya menunjukkan aktivitas enzim terhadap senyawa karbonil terkonjugasi glutathione, namun 1B1 tampak lebih aktif secara umum. Penelitian ini menunjukkan bahwa, 1B1 penting dalam detoksifikasi lebih lanjut senyawa karbonil terkonjugasi glutathione. (Shen, 2011).

3.4. Metode Ekstraksi Berdasarkan Sifat Kimia dan Fisika Senyawa Aktif

Metode ekstraksi didasarkan kepada Buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Farmakope Herbal Indonesia serta surat edaran No. HK. 04.02.42.421.12.17.1673 tentang Pelarut yang diizinkan digunakan dalam proses ekstraksi/fraksinasi tumbuhan dalam produk obat bahan alam dan suplemen kesehatan beserta batasan residunya.

Farmakope Herbal Indonesia memberikan tuntunan pembuatan ekstrak <311> dengan mengutamakan metode maserasi selama 18 jam dan perbandingan pelarut 10:1. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat memberikan penjelasan lebih rinci terkait metode ekstraksi, namun kedua dokumen tersebut tidak memberikan tuntunan sebaiknya pelarut apa yang digunakan untuk prosedur ekstraksi terbaik.

Berdasarkan pertimbangan tersebut diatas maka sifat fisika dan kimia senyawa aktif perlu dicari agar ditemukan prosedur ekstraksi yang sesuai. NCBI adalah acuan utama dalam penentuan sifat fisika, adapun data yang diperlukan adalah kelarutan pada solvent tertentu dan tingkat polaritas senyawa. Untuk menentukan pelarut yang sesuai digunakan metode pendekatan kemiripan nilai *Topological Polar Surface Area* atau disingkat TPSA (Nilai kuantitasi kepolaran) dan kemungkinan ikatan hidrogen terjadi antara senyawa aktif dengan senyawa pelarut yang ditandai dengan kemiripan donor dan penerimaan hidrogen (Tabel 3).

Tabel 3. Metode Ekstraksi Berdasarkan Sifat Fisio-Kimia Senyawa Aktif
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=>)

Nama Senyawa	Kelarutan	Donor Hidrogen	Penerima Hidrogen	Polaritas (TPSA)
Chlorogenic	40 mg/ml pada	6	9	165Å ²

Acid	25°C di dalam ethanol			
Axillarin	-	4	8	126Å ²
Kaempferol	Sedikit larut di air, namun di larut ethanol panas dan di-ethyl eter	4	6	107Å ²
Quercetin	1. Sangat larut di : ether, methanol; 2. Larut di : ethanol, acetone, pyridine, dan asam asetat glasial	5	7	127Å ²
Ellagic Acid	Sedikit larut di : golongan alkohol, pyridine dan air	4	8	134Å ²
Tryptophan	-	3	3	79.1Å ²
Lutein	Tidak larut di air	2	2	79.1Å ²

Senyawa organik yang digunakan untuk proses ekstraksi selain air dan etanol setidaknya terdapat total 55 pelarut dengan sifat nya masing - masing. Pada penelitian ini ditentukan 5 pelarut polar yang digunakan untuk proses ekstraksi termasuk air dan ethanol. Pemilihan *solvent* polar karena nilai TPSA keseluruhan diatas 0, artinya tidak ada senyawa aktif yang bersifat non polar.

Tabel 3. Metode Ekstraksi Berdasarkan Sifat Fisis-Kimia Senyawa Aktif (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=>)

Nama Pelarut	Rumus Senyawa	Donor Hidrogen	Penerima Hidrogen	Polaritas (TPSA)
Acetone	C ₃ H ₆ O	0	1	17.1Å ²
Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂	0	2	26.3Å ²
Ethanol	C ₂ H ₆ O	1	1	20.2Å ²
Methanol	CH ₃ OH	1	1	20.2Å ²

Air	H ₂ O	1	1	1Å ²
-----	------------------	---	---	-----------------

Ethyl acetate memiliki nilai TPSA tertinggi diantara pelarut polar lain, hal ini bisa berpotensi menjadi pelarut terbaik untuk ekstraksi 7 senyawa aktif diatas. Namun, sifat spesifik lain perlu diperhatikan pada saat ekstraksi, karena kombinasi dari beberapa pelarut bisa saja memberikan improvement pada hasil rendemen ekstrak.

Nilai ekonomis bisa saja menjadi pertimbangan dalam ekstraksi senyawa aktif, dalam hal pelarut maka air adalah pelarut paling ekonomis. Apabila ekstraksi menggunakan pelarut air dengan harapan khasiat sesuai dengan protein target, maka masih bisa didapatkan melalui senyawa kaempferol dan Ellagic Acid karena keduanya memiliki potensi berinteraksi dengan TRIM24 dan AKR1B1.

Metode ekstraksi terbagi menjadi 2, yaitu secara dingin : Maserasi dan perkolasi dan secara panas : Dekokta, Infusa, Refluks, soxhlet dan digesti. Pada penelitian ini apabila menggunakan [pelarut selain air menggunakan metode ekstraksi secara dingin baik maserasi maupun perkolasi, bisa juga ekstraksi panas menggunakan refluks dan digesti, sedangkan apabila menggunakan air digunakan metode dekok atau infusa. Pertimbangan tersebut didasarkan atas keamanan pelarut dan efisiensi prosedur ekstraksi.

4. KESIMPULAN

Senyawa aktif pada bunga *Tagetes erecta* L. meliputi Chlorogenic acid, Axillarin, Kaempferol, Quercetin, Ellagic acid, Tryptophan dan Lutein. Senyawa tersebut diprediksi oleh STP bahwa Axillarin, Ellagic acid, Kaempferol, Quercetin berinteraksi 100% terhadap protein AKR1B1 dan Chlorogenic acid dengan kemungkinan sebesar 87,21% Sedangkan SP memprediksi bahwa Ellagic acid, Chlorogenic acid, Lutein dan Tryptophan berinteraksi terhadap protein TRIM 24 dengan kemungkinan hingga lebih dari 80% .

Fungsi dari masing - masing protein bisa berpotensi menjadi khasiat dari senyawa aktif dari bunga *Tagetes erecta* L. TRIM24 berfungsi sebagai : (1) degradasi protein p53 setelah perbaikan DNA agar siklus sel berlanjut dan tidak terjadi kematian sel karena p53 yang berlebih sehingga meningkatkan metabolisme sel; (2) dapat berinteraksi dengan TRAF3 sehingga meningkatkan fungsi aktifitas antiviral terhadap virus RNA; (3) TRIM4 juga bisa menekan biomarker Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), caspase-1 (CASP1), dan interleukin-1beta (IL-1beta) sehingga mencegah terjadi translokasi sel dari yang tidak seharusnya dan mengurangi inflamasi pada pasien endometriosis.

AKR1B1 ini secara umum merupakan protein yang dapat mengkatalisis reduksi NADP⁺ dan aldehyd fosfolipid. Pada pasien diabetes protein ini berfungsi : (1) sebagai pereduksi aldose reduktase yang digunakan untuk mereduksi glukosa menjadi sorbitol sehingga terhindar dari komplikasi untuk pasien diabetes; (2) Golongan AKR (termasuk AKR1B1) dapat mereduksi steroid dan prostaglandin di dalam tubuh maka berpotensi sebagai antiinflamasi; (3) Dapat mereduksi aldehyda fosfolipid karena AKR1B1 dapat bekerja baik pada fosfatidil gliserol yang artinya secara implisit dapat menjadi antioksidan; (4) AKR1B1 dapat mereduksi karbonil agar tidak menimbulkan efek racun di dalam tubuh ketika terkonjugasi dengan glutathione.

Senyawa aktif diekstrak dengan pelarut Acetone, Ethyl Acetate, Ethanol, Methanol dan Air. Metode ekstraksi menjadi variabel tidak tetap yang dapat digunakan dalam penentuan tingkat efisiensi prosedur ekstraksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410.
- Armstrong, M.S., Finn, P.W., Morris, G.M. and Richards, W.G. (2011). Improving the accuracy of ultrafast ligand-based screening: incorporating lipophilicity into ElectroShape as an extra dimension. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 25, 785–790.
- Borhani, D. W., Harter, T. M., & Petrash, J. M. (1994). The Crystal Structure of the Aldose Reductase NADPH BINARY COMPLEX. <https://doi.org/10.2210/pdb1abn/pdb>.
- Burlec, A. F., Pecio, L., Kozachok, S., Mircea, C., Corciovă, A., Vereștiuc, L., ... & Hăncianu, M. (2021). Phytochemical profile, antioxidant activity, and cytotoxicity assessment of *Tagetes erecta* L. flowers. *Molecules*, 26(5), 1201.
- Campillos, M., Kuhn, M., Gavin, A.C., Jensen, L.J. and Bork, P. (2008). Drug target identification using side-effect similarity. *Science*, 321, 263–266.
- Crosas, B., Hyndman, D. J., Gallego, O., Martras, S., Parés, X., Flynn, T. G., & Farrés, J. (2003). Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *The Biochemical journal*, 373(Pt 3), 973–979. <https://doi.org/10.1042/BJ20021818>
- Di Fiore, A., Monti, S. M., Hilvo, M., Parkkila, S., Romano, V., Scaloni, A., Pedone, C., Scozzafava, A., Supuran, C. T., & De Simone, G. (2009). Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. *Proteins*, 74(1), 164–175. <https://doi.org/10.1002/prot.22144>.
- Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W32–W38. doi:10.1093/nar/gku293.
- Hamada, Y., Kitoh, R., & Raskin, P. (1991). Crucial role of aldose reductase activity and plasma glucose level in sorbitol accumulation in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes*, 40(10), 1233–1240. <https://doi.org/10.2337/diab.40.10.1233>
- Hang, Y., Tan, L., Chen, Q., Liu, Q., & Jin, Y. (2021). E3 ubiquitin ligase TRIM24 deficiency promotes NLRP3/caspase-1/IL-1 β -mediated pyroptosis in endometriosis. *Cell biology international*, 45(7), 1561–1570. <https://doi.org/10.1002/cbin.11592>
- Jain, A. K., Allton, K., Duncan, A. D., & Barton, M. C. (2014). TRIM24 is a p53-induced E3-ubiquitin ligase that undergoes ATM-mediated phosphorylation and autodegradation during DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 34(14), 2695–2709. <https://doi.org/10.1128/MCB.01705-12>.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J. C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrançois-Martinez, A. M., Martinez, A., & Urade, Y. (2009). Prostaglandin F2 α synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *Journal of biochemistry*, 145(2), 161–168. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn152>
- Keiser, M.J., RBriganti, F., Mangani, S., Scozzafava, A., Vernaglione, G., & Supuran, C. T. (1999). Carbonic anhydrase catalyzes cyanamide hydration to urea: is it mimicking the physiological reaction. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 4(5), 528–536. <https://doi.org/10.1007/s007750050375> .
- Kishishita, S., Uchikubo-Kamo, T., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., & Yokoyama, S. (2008). Crystal Structure of Human Bromodomain Protein. <https://doi.org/10.2210/pdb2yyn/pdb>.
- Liu, S. Q., Bhatnagar, A., Ansari, N. H., & Srivastava, S. K. (1993). Identification of the reactive cysteine residue in human placenta aldose reductase. *Biochimica et biophysica acta*, 1164(3), 268–272. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90258-s](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90258-s)

- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5281243, Lutein. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lutein>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 6305, Tryptophan. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptophan>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5281855, Ellagic Acid. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ellagic-Acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 1794427, Chlorogenic Acid. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic-Acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5281603, Axillarin. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Axillarin>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5280863, Kaempferol. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5280343, Quercetin. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 8857, Ethyl Acetate. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-Acetate>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 8058, n-HEXANE. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n-HEXANE>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 962, Water. Retrieved December 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Water>.
- Oth,B.L., Armbruster,B.N., Ernsberger,P., Irwin,J.J. and Shoichet,B.K. (2007). Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat. Biotechnol.*, 25, 197–206.
- Santi, N. M. (2021). AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK BUNGA GEMITIR (*Tagetes erecta* Linn.). *Jurnal Farmagazine*, 8(1), 25-31.
- Shen, Y., Zhong, L., Johnson, S., & Cao, D. (2011). Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: a comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chemico-biological interactions*, 191(1-3), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.02.004>
- Spite, M., Baba, S. P., Ahmed, Y., Barski, O. A., Nijhawan, K., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., & Srivastava, S. (2007). Substrate specificity and catalytic efficiency of aldo-keto reductases with phospholipid aldehydes. *The Biochemical journal*, 405(1), 95–105. <https://doi.org/10.1042/BJ20061743>
- Willett,P. (2011). Similarity searching using 2D structural fingerprints. *Methods Mol. Biol.*, 672, 133–158.
- Zhu, Q., Yu, T., Gan, S., Wang, Y., Pei, Y., Zhao, Q., Pei, S., Hao, S., Yuan, J., Xu, J., Hou, F., Wu, X., Peng, C., Wu, P., Qin, J., & Xiao, Y. (2020). TRIM24 facilitates antiviral

immunity through mediating K63-linked TRAF3 ubiquitination. *The Journal of experimental medicine*, 217(7), e20192083. <https://doi.org/10.1084/jem.20192083>