

## **KAJIAN IN SILICO DAN KARAKTERISASI FISIKO-KIMIA**

**KOMPLEKS ASPIRIN-ALBUMIN PUTIH TELUR-CAFFEINE SEBAGAI**

**PELURUH RADIKAL BEBAS**

**DISERTASI**

**oleh**

**GATRA ERVI JAYANTI**

**137090100111011**



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

## **KAJIAN IN SILICO DAN KARAKTERISASI FISIKO-KIMIA**

### **KOMPLEKS ASPIRIN-ALBUMIN PUTIH TELUR-CAFFEINE SEBAGAI PELURUH RADIKAL BEBAS**

#### **DISERTASI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Doktor dalam bidang Biologi

oleh

**GATRA ERVI JAYANTI**

**137090100111011**



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository  
Repository  
Repository  
Repository  
Repository

## **HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI**

**KAJIAN IN SILICO DAN KARAKTERISASI FISIKO-KIMIA**

**KOMPLEKS ASPIRIN-ALBUMIN PUTIH TELUR-CAFFEINE SEBAGAI  
PELURUH RADIKAL BEBAS**

**GATRA ERVI JAYANTI**

**NIM 137090100111011**

Telah dipertahankan di depan Majelis Pengudi  
pada tanggal 24 Juli 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Doktor dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Prof. Sutiman Bambang Sumitro, S.U., D.Sc

NIP. 195403111980021002

Ko-promotor I

Ko-promotor II

Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Sc., Dr.Sc

NIP. 197404181997021001

Dr. Sri Widarti, M.Si

NIP. 196705251991032001

Mengetahui

Ketua Program Studi Doktor Biologi

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, M.Sc.St

NIP. 196308181988022001

## **SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI DISERTASI**

## Judul Disertasi:

# KAJIAN *IN SILICO* DAN KARAKTERISASI FISIKO-KIMIA KOMPLEKS ASPIRIN-ALBUMIN PUTIH TELUR-CAFFEINE SEBAGAI PELURUH RADIKAL BEBAS

Nama : Gatra Ervi Jayanti

NIM Universitas Brawijaya : 137090100111011

# KOMISI PROMOTOR

Promotor : Prof. Sutiman Bambang Sumitro, SU., D.Sc

Ko-Promotor I : Akhmad Sabaridin, S.Si., M.Sc., Dr.Sc.

Ko-Premeter II : Dr. Sri Widuarti, M.Si

## **TIM DOSEN PENGUJI**

Dosen Pengajar Brawijaya · Prof Sutiman Bamhang Sumitro SU D.Sc

Dosen Pengajar II : Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Sc., Dr.Sc.

Digitized by Universitas Brawijaya Repository. Dr. Sri Widuarti, M.S.

Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya

Bogor University Repository

Buah Pengaruh Was Drawijaya Terhadap Siswa Kelas XI IPS 10 SMA Negeri 1 Bantul

Dosen Penguji VI : Prof. Muhammin Rifa'i, S.Si., Ph.D.Med.Sc

Dosen Penguji VII : Prof. Dr. agr. H. Moh Amin, S.Pd., M.Si.

(Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Malang)

Repository Universitas Brawijaya

Seminar Hasil Penelitian · 8 Juni 2018

Ujian Kelayakan Disertasi : 12 Juli 2018

Universitas Brawijaya Repository

Jian Anmin & Iberasi Jan 2018  
Universitas Brawijaya - Bandung

Universitas Brawijaya | Universitas Brawijaya



## **HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Disertasi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, Agustus 2018

Nama : Gatra Ervi Jayantia

NIM : 137090100111011

## **RIWAYAT HIDUP**

Gatra Ervi Jayanti, lahir di Tulungagung, tanggal 10 September 1984, anak pertama dari dua bersaudara, putri dari Bapak Sukatno, S.Pd dan ibu Tutik Sriani S.Pd. Riwayat pendidikan yang pernah ditempuh Sekolah Dasar Negeri (SDN) 1 Kauman lulus tahun 1997, Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 1 Kauman lulus tahun 2000, Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 1 Gondang lulus tahun 2003 di Tulungagung. Selanjutnya, menempuh pendidikan Strata 1 (S-1) di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya lulus tahun 2007, menempuh pendidikan Strata 2 (S-2) pada Jurusan Biologi Universitas Brawijaya lulus tahun 2010. Pada tahun 2011 mulai bekerja sebagai Peneliti di Lembaga Penelitian Peluruhannya Radikal Bebas Malang sampai sekarang. Sejak tahun 2013 menempuh pendidikan Strata 3 (S-3) pada Jurusan Biologi Universitas Brawijaya.

Malang, Agustus 2018

Penulis

Gatra Ervi Jayanti

## **PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI**

Disertasi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

## **RINGKASAN**

### **Kajian *in Silico* dan Karakterisasi Fisiko-Kimia Kompleks Aspirin-Albumin Putih Telur-Caffeine sebagai Peluruh Radikal Bebas**

Gatra Ervi Jayanti, Sutiman Bambang Sumitro, Akhmad Sabarudin, Sri Widayati  
Program Pascasarjana Universitas Brawijaya  
2018

Tubuh sebagai sistem redoks yang secara alami menghasilkan oksidan atau radikal bebas hasil dari metabolisme. Radikal bebas adalah atom atau kelompok atom yang berisi elektron tidak berpasangan, sangat reaktif dan memulai reaksi berantai. Tubuh secara alami bisa menangkal radikal bebas misalnya dengan SOD dan katalase. Tetapi bila radikal bebas tersebut memiliki jumlah yang lebih maka akan menimbulkan kondisi patologis. Radikal bebas yang berlebih memerlukan antioksidan dari luar tubuh. Antioksidan yang tidak berubah menjadi radikal ketika menerima atau kehilangan elektron. Pada penelitian ini digunakan aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* sebagai *scavenger* kompleks. Albumin, adalah peluruh radikal bebas alamiah diperoleh dari putih telur ayam yang mudah di peroleh, murah dan halal. Albumin putih telur merupakan *scavenger* radikal bebas yang mampu membentuk kompleks dengan aspirin, *caffeine*, dan vitamin. Selama ini antioksidan yang digunakan untuk menangkal radikal bebas, pada umumnya dikenal sebagai senyawa tunggal (seperti vitamin C dan E), sedangkan dalam tubuh merupakan aliran elektron yang mengalir secara terus-menerus. Bila antioksidan menyumbangkan elektron kepada atom yang kehilangan elektron, maka antioksidan tersebut akan menjadi radikal baru, oleh karena itu senyawa kompleks dibutuhkan sebagai *scavenger*.

Tujuan dari penelitian ini untuk mendeskripsikan perubahan struktur ovalbumin setelah mengikat aspirin dan *caffeine*, melihat perubahan struktur kompleks dengan perlakuan suhu, mengetahui kemampuan senyawa kompleks sebagai *scavenger* dibandingkan dengan bentuk tunggalnya, gugus fungsi apa saja yang terdapat pada senyawa tunggal dan kompleks, dan untuk mengetahui nilai viskositas albumin ketika ditambahkan masing-masing senyawa. Penelitian dilakukan menggunakan software komputer (*in silico*), struktur aspirin, *caffeine* dari Pubchem dan ovalbumin diperoleh dari National for Biotechnology Information (NCBI), docking molekul dengan program Pyrex. Visualisasi hasil docking menggunakan program Pymol dan keberhasilan docking dapat dilihat dengan program LigPlot. Ovalbumin Hydrophobicity menggunakan program Chimera, Interaksi aspirin dan *caffeine* terhadap ovalbumin menggunakan program Ligandscout dan program Yasara untuk analisis Root-Mean-Square-Deviation. Dalam penelitian laboratorium, aktivitas radikal aspirin, *caffeine*, albumin putih telur, aspirin-albumin putih telur, *caffeine*-albumin putih telur, dan aspirin-albumin putih-*caffeine* (kompleks) dipelajari dengan menggunakan ESR dengan menggunakan DPPH sebagai radikal bebas.

Hasil analisa *in silico* menunjukkan bahwa setelah mengikat ovalbumin, aspirin berotasi pada gugus karboksil dan ester dan menghasilkan perubahan sudut ikatan. Perubahan ini tidak terlihat secara jelas pada *caffeine*. Aspirin dan *caffeine* mengandung cincin siklik, tetapi aspirin mempunyai kelompok fungsional (rantai alifatik) yang lebih fleksibel daripada *caffeine*. Perubahan sudut ikatan yang terjadi pada aspirin disebabkan oleh penyusunan ulang atom. Analisis RMSD menunjukkan bahwa aspirin, serta *caffeine*, mengubah konformasi dinamis ovalbumin. RMSD kompleks hampir bertepatan dengan garis ovalbumin, dan tidak menunjukkan perubahan ikatan kimia yang signifikan terhadap struktur ovalbumin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sifat ovalbumin tidak berubah, ini

alasan mengapa ovalbumin tidak mempengaruhi farmakokinetik; ovalbumin juga bertindak sebagai *transporter* aspirin dan *caffeine*. Serta dapat diterapkan sebagai antioksidan *scavenger* yang efektif. Kompleks aspirin-ovalbumin-*caffeine* dengan perlakuan suhu -70 °C menunjukkan *intermolecular force*. Selama proses *freeze-drying*, kompleks telah kehilangan air menjadi padat dan berpengaruh pada ikatan kimia. Medan magnet menjadi lebih kuat selama pembekuan kompleks. Pada kompleks, gerak atom stabil tetapi tidak fungsional, sehingga menghasilkan penguatan ikatan magnetik. Sementara ikatan hidrofobik kompleks melemah. Semua atom mulai saling menempel, dengan demikian, stabilitas struktur kompleks meningkat (tidak terdenaturasi) yang dapat mengubah fungsinya untuk menjadi *scavenger* yang kuat.

Kompleks menghasilkan puncak resonansi magnetik DPPH paling rendah dibandingkan bentuk tunggalnya (aspirin, albumin putih telur dan juga *caffeine*). Semua analisis FTIR dalam penelitian ini menunjukkan adanya kelompok aromatik, yang berguna sebagai molekul *scavenger*. Nilai viskositas kompleks berada di antara nilai albumin-aspirin dan albumin-*caffeine*, yaitu 6,87 cP yang hampir mirip dengan viskositas duodenum *mucin*.

ii

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

## SUMMARY

### **Study of the *in Silico* and Physic-Chemical Characterization Aspirin-Egg White Albumin-Caffeine Complex Interaction as Free Radical Scavenging**

Gatra Ervi Jayanti, Sutiman Bambang Sumitro, Akhmad Sabarudin, Sri Widayarti

Doctoral Program at Brawijaya University

2018

A body, as a redox system continually, produces oxidants or free radicals. Free radicals are atoms or groups of atoms containing unpaired electrons and already highly reactive radicals and initiate chain reactions. Almost all pathological conditions are initiated from the production of excessive free radicals. So it becomes important to find the ways to scavenge free radicals using antioxidants, which does not turn into a radical when receiving or losing electrons (scavenger). In this study, aspirin, egg white albumin and caffeine are used as a complex scavenger. Albumin is a natural free radical scavenger, obtained from chicken egg which is easy to be obtained, cheap and halal. Albumin egg whites have a very important role, it is a free radical scavenger and able to form complexes with aspirin, caffeine, and vitamins. Commonly antioxidants are used to scavenge free radicals, usually known as single compounds (such as vitamins C and E), while in the body it is electrons hopping that flow continuously. When antioxidants donate electrons, it becomes a new radical, therefore complex compounds are needed as scavengers.

The objective of this research was to investigate changes in ovalbumin structure when added aspirin and caffeine, and when complex treated with various temperature, to determine the ability of complex compounds as a scavenger compared with single antioxidants, to determine any functional group found in single and complex compounds and to determine the viscosity of albumin when each compound is added. The research was conducted using computer software (*in silico*), aspirin, and caffeine structure from PubChem and ovalbumin from National for Biotechnology Information (NCBI), and then performed molecular docking with Pyrex program. Visualization of docking results using Pymol program and docking success can be seen with LigPlot program. Ovalbumin Hydrophobicity uses the Chimera program, aspirin and caffeine interaction to ovalbumin uses LigandScout program, and the Yasara program for Root-Mean-Square-Deviation analysis.

In this work, the variability of tridimensional structures of aspirin was shown after binding to ovalbumin. Aspirin model was rotated, and it resulted in the change of its angle. This variability, however, could not be seen clearly on caffeine. Both aspirin and caffeine contained the cyclic ring, but aspirin had another functional group (aliphatic chain), which was more flexible than caffeine. The angular changes that occurred in aspirin were caused by the atom rearrangements.

RMSD analysis showed that aspirin, as well as caffeine, altered the dynamic conformation of ovalbumin. Complex of RMSD (purple line) was almost coincident with ovalbumin line (blue line), and showed no significant chemical bond change to ovalbumin structure. This result meant that the nature of ovalbumin remained unchanged. This was the reason why ovalbumin did not affect in pharmacokinetics; ovalbumin also acted as a transporter of aspirin and caffeine. It could be applied as an effective antioxidant scavenger. The complex of aspirin-ovalbumin-caffeine was treated at -70 °C showed intermolecular force. During freeze-drying process, the complex had lost water to become a solid and affected to the chemical bond. Magnetic field became stronger during the complex freezing. The motion of atoms in the complex was stable but not functional, which resulted

in the strengthening of a magnetic bond, while hydrophobic bond in the complex weakened. All atoms started sticking to each other. Accordingly, the stability of complex structure increased (no denaturation) which could transform its function to be a stronger scavenger.

In this study, the radical scavenging activities of aspirin, caffeine, egg white albumin, aspirin-egg white albumin, caffeine-egg white albumin, and aspirin-egg white albumin-caffeine (complex) were studied by using ESR by using DPPH as the free radical. The DPPH peak decreased more drastically when the complex compound (aspirin-egg white albumin-caffeine) was added, rather than the addition of aspirin, egg white albumin, and caffeine. When a combination of the aspirin-egg white albumin or the caffeine-egg white albumin was added, the peak of the DPPH radical decreased lower than the single addition of aspirin and caffeine.

All FTIR analyses in this study showed the existence of aromatic groups, which were useful for the scavenger molecules. The viscosity of the complex (aspirin-egg white albumin-caffeine) was 6.87 cP, which was almost similar to the viscosity of duodenal mucin.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, hanya dengan Rahmad-Nya naskah Disertasi yang berjudul “Kajian *in Silico* dan Karakterisasi Fisiko-Kimia Kompleks Aspirin-Albumin Putih Telur-Caffeine sebagai Peluruh Radikal Bebas” dapat diselesaikan. Penyusunan naskah ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, maka dari itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Rektor Universitas Brawijaya atas kesempatan yang telah diberikan untuk mengikuti Program Doktor Biologi Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya
2. Dekan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya atas kesempatan yang telah diberikan untuk mengikuti Program Doktor Biologi Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya.
3. Prof. Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, M.Sc.St. selaku Ketua Program Doktor Biologi dan Luchman Hakim, S.Si., M.Sc., Ph.D selaku Ketua Jurusan Biologi, yang telah memberikan arahan dan semangat untuk segera menyelesaikan studi.
4. Tim Pembimbing: Prof. Sutiman Bambang Sumitro, SU. D.Sc. selaku Promotor, Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Sc., Dr.Sc. selaku Ko-Promotor I, dan Dr. Sri Widarti, M.Si selaku Ko-Promotor II, yang telah meluangkan banyak waktu untuk membimbing, memberikan masukan, saran dan motivasi selama penelitian dan penyusunan naskah Disertasi.
5. Tim penguji: Ir. D.J. Djoko Herry Santjojo, M. Phil., Ph. D selaku penguji 1, Chomsin S. Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D selaku penguji 2 dan Prof. Muhammin Rifa'i S.Si., Ph.D.Med.Sc. selaku penguji 3, yang telah bersedia menguji, memberikan saran untuk penelitian dan penulisan Disertasi.
6. Prof. Widodo, S.Si., M.Si.,Ph.D.Med.Sc yang telah membimbing dan memberikan masukan pada penelitian *in silico*.
7. Lembaga Penelitian Peluruhan Radikal Bebas, Malang, yang telah memberikan beasiswa pendidikan dan penelitian
8. dr. Saraswari, MP.Si dan Ir. Trintrim Rahayu, M.Si selaku pimpinan Lembaga Penelitian Peluruhan Radikal Bebas Malang yang telah memberikan kesempatan dan motivasi untuk melakukan studi.
9. Dr. Ekowati Retnaningtyas SK.p.M.Kes yang telah mengizinkan menggunakan alat viscometer, dan Ko Hendra yang telah menyediakan *fresh egg* langsung dari peternakan.

10. Seluruh Dosen pengampu mata kuliah pada Program Doktor Biologi yang telah memberikan pengetahuan dan bimbingan selama menempuh studi.
11. Seluruh staf administrasi Program Doktor Biologi yang telah membantu selama menempuh studi.
12. Seluruh instansi terkait yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk melakukan penelitian.
13. Seluruh laboran pada laboratorium terkait yang telah membantu penelitian.
14. Teman-teman mahasiswa S3, khususnya angkatan 2013 (Bu Sukma, Bu Murti, Bu Indah, Bu Nia, Bu Eny, Bu Mulyati, Bu Kartini, Pak Teguh, Pak Irvan, Pak Djuhari, Pak Sutoyo, Pak Agung, Pak Alwi) yang saling memberi semangat untuk maju terus, dan jatuh bangun bersama.
15. Dr. Listiani, Dr. Yanti Maryanti, Dr. Wahyu, Wulida S.Si dan seluruh anggota *Working Group Complex Science*, yang telah berbagi ilmu dan saling memberikan dukungan.
16. Keluarga, terimakasih kepada bapak Sukatno S.Pd, Ibu Tutik Sriani S.Pd dan adek Restu Asri Restiani, S.Si, S.Pd, M.Pd, yang selalu mendukung, memberikan semangat dan doa. Suami, Achmad Syahroni S.Si yang telah memberikan dukungan, serta anak-anak Delisha Hana Azzahra dan Daanish Zaviar Achmad yang selalu menjadi semangat untuk terus berjuang.
17. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian naskah proposal Disertasi ini. Penulisan naskah Disertasi ini masih perlu penyempurnaan, oleh karena itu kritik dan saran diharapkan untuk perbaikan. Semoga isi Disertasi ini bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2018

Penulis

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository
<b>RINGKASAN</b>	<b>DAFTAR ISI</b>	Halaman	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	iii	Repository
<b>SUMMARY</b>	Repository Universitas Brawijaya	v	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	vii	Repository
<b>KATA PENGANTAR</b>	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	ix	Repository
<b>DAFTAR ISI</b>	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
<b>DAFTAR TABEL</b>	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b>	Repository Universitas Brawijaya	x	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	1	Repository
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	Repository Universitas Brawijaya	1	Repository
1.1 Latar Belakang	Repository Universitas Brawijaya	1	Repository
1.2 Rumusan Masalah	Repository Universitas Brawijaya	5	Repository
1.3 Tujuan Penelitian	Repository Universitas Brawijaya	5	Repository
1.4 Manfaat Penelitian	Repository Universitas Brawijaya	5	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	6	Repository
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	Repository Universitas Brawijaya	6	Repository
2.1 Sistem Peluruhan Radikal Bebas dan Fisiologi Sel	Repository Universitas Brawijaya	6	Repository
2.1.1 Radikal Bebas	Repository Universitas Brawijaya	6	Repository
2.1.2 Peluruhan Radikal Bebas	Repository Universitas Brawijaya	9	Repository
2.1.3 Aspirin ( <i>Acetylsalicylic acid</i> )	Repository Universitas Brawijaya	11	Repository
2.1.4 <i>Caffeine</i>	Repository Universitas Brawijaya	13	Repository
2.1.5 Albumin Putih Telur	Repository Universitas Brawijaya	14	Repository
2.2 Analisis Pendukung untuk Mengetahui Karakter Senyawa Kompleks	Repository Universitas Brawijaya	16	Repository
2.2.1 Kajian Senyawa Kompleks melalui Komputer Modeling ( <i>In Silico</i> )	Repository Universitas Brawijaya	16	Repository
2.2.2 <i>Electron Spin Resonance</i> (ESR)	Repository Universitas Brawijaya	17	Repository
2.2.3 <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	Repository Universitas Brawijaya	18	Repository
2.2.4 Viskositas	Repository Universitas Brawijaya	19	Repository
2.3 Kerangka Konsep Penelitian	Repository Universitas Brawijaya	20	Repository
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	Repository Universitas Brawijaya	22	Repository
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	Repository Universitas Brawijaya	22	Repository
3.2 Kerangka Operasional	Repository Universitas Brawijaya	22	Repository
3.3 Prosedur Penelitian	Repository Universitas Brawijaya	23	Repository
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	Repository Universitas Brawijaya	26	Repository
4.1 Analisis Modeling Komputer ( <i>In Silico</i> )	Repository Universitas Brawijaya	26	Repository
4.2 Karakterisasi	Repository Universitas Brawijaya	35	Repository
4.2.1 Analisis ESR	Repository Universitas Brawijaya	35	Repository
4.2.2 Analisis FTIR	Repository Universitas Brawijaya	38	Repository
4.2.3 Viskositas	Repository Universitas Brawijaya	41	Repository
4.3 Keterkaitan Penelitian	Repository Universitas Brawijaya	42	Repository
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	Repository Universitas Brawijaya	44	Repository
5.1 Kesimpulan	Repository Universitas Brawijaya	44	Repository
5.2 Saran	Repository Universitas Brawijaya	44	Repository
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	Repository Universitas Brawijaya	45	Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
vii	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya		Repository

**DAFTAR TABEL**

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Nomor	Halaman	
1 Contoh faktor endogenus dan eksogenus yang menghasilkan pembentukan oksidan.....	8	
2 Antioksidan pada putih telur .....	15	
3 Asam amino ovalbumin yang berinteraksi dengan aspirin dan <i>caffeine</i> setelah terjadi kompleks .....	28	
4 Gugus fungsi dari senyawa tunggal dan kompleks .....	40	
5 Viskositas .....	41	

DAFTAR GAMBAR	Halaman
1 Struktur kimia aspirin 2D (A), dan struktur kimia aspirin 3D (B)	12
2 Struktur kimia <i>caffeine</i> 2D (A), dan struktur kimia <i>caffeine</i> 3D.	
Warna merah merupakan atom O sedangkan warna biru merupakan atom N	13
3 Kerangka konsep penelitian	21
4 Kerangka operasional penelitian	23
5 Hasil docking aspirin-ovalbumin- <i>caffeine</i>	26
6 Ikatan asam amino ovalbumin terhadap aspirin (A) dan <i>caffeine</i> (B). Ikatan hidrogen ditunjukkan dengan sebuah garis hijau dan ikatan hidrofobik ditunjukkan dengan garis kecil-kecil pada atom	27
7 Ovalbumin <i>Hydrophobicity</i> . Sisi ovalbumin yang membentuk kompleks dengan aspirin (A) dan <i>caffeine</i> (B), dari dodger warna biru untuk yang paling hidrofilik, ke warna putih, ke orange merah untuk yang paling hidrofobik	29
8 Interaksi aspirin dan caffeine terhadap asam amino pada ovalbumin setelah terjadi kompleks. (A) Aspirin 3D, (B) Aspirin 2D, (C) Caffeine 3D, (D) Caffeine 2D	31
9 Struktur kimia aspirin (A, B) dan <i>caffeine</i> (C) ketika dibandingkan, sebelum (warna merah) dan sesudah (warna hijau) terjadi <i>docking</i> dengan ovalbumin	32
10 The Root-Mean-Square-Deviation (RMSD) dari ovalbumin, aspirin dan <i>caffeine</i> .	33
11 The Root-Mean-Square-Deviation (RMSD) perlakuan suhu dari ovalbumin dan kompleks	34
12 <i>Electron Spin Resonance</i> dari aspirin, albumin putih telur dan <i>caffeine</i> (A), DPPH setelah ditambah aspirin, <i>caffeine</i> , albumin putih telur dan kompleks (B), DPPH setelah ditambah dengan aspirin-albumin putih telur, <i>caffeine</i> -albumin putih telur (C)	36
13 Spektrum FTIR. (A) Aspirin, <i>caffeine</i> dan albumin putih telur. (B) Aspirin kombinasi dengan albumin putih telur, <i>caffeine</i> kombinasi dengan albumin putih telur, dan kompleks	39

Lambang/Simpangan	<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b>	Keterangan
Å	amstrong	Repository Universitas Brawijaya
ACE-inhibitory	angiostensin I-converting enzyme	Repository Universitas Brawijaya
BATAN	Badan Tenaga Nuklir Nasional	Repository Universitas Brawijaya
CAT	catalase	Repository Universitas Brawijaya
cP	centipoise	Repository Universitas Brawijaya
COX	cyclooxygenase	Repository Universitas Brawijaya
C=O	asam karboksilat	Repository Universitas Brawijaya
°C	derajat Celsius	Repository Universitas Brawijaya
DNA	Deoxyribonucleic acid	Repository Universitas Brawijaya
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	Repository Universitas Brawijaya
EMR	Electron Magnetic resonance	Repository Universitas Brawijaya
ESR	Electron Spin Resonance	Repository Universitas Brawijaya
FTIR	Fourier Transform Infrared	Repository Universitas Brawijaya
E.coli	Escherichia coli	Repository Universitas Brawijaya
GSHPx	glutathione peroxidase	Repository Universitas Brawijaya
HOX	hydroperoxidase	Repository Universitas Brawijaya
mM	milli Molar	Repository Universitas Brawijaya
mm <sup>2</sup>	milli meter persegi	Repository Universitas Brawijaya
NOS	Nitric Oxide Synthases	Repository Universitas Brawijaya
NOx	Nitrogen Oksida	Repository Universitas Brawijaya
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs	Repository Universitas Brawijaya
RMSD	Root-Mean-Square-Deviation	Repository Universitas Brawijaya
RNS	Reactive Nitrogen Spesies	Repository Universitas Brawijaya
ROS	Reactive Oxygen Spesies	Repository Universitas Brawijaya
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxide	Repository Universitas Brawijaya
OH <sup>•</sup>	Hydroxyl	Repository Universitas Brawijaya
s	sekon	Repository Universitas Brawijaya
SOD	Superoxide Dismutase	Repository Universitas Brawijaya
SOx	Sulfur oxides (SOx)	Repository Universitas Brawijaya
UV	Ultra-Violet	Repository Universitas Brawijaya
2D	dua dimensi	Repository Universitas Brawijaya
3D	tiga dimensi	Repository Universitas Brawijaya
%	persen	Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Tubuh sebagai sistem redoks dipastikan menghasilkan oksidan atau radikal bebas. Hampir semua kondisi patologis bermula dari produksi radikal bebas yang berlebih, karena itu menjadi penting untuk mencari cara menangkal radikal bebas menggunakan antioksidan. Saat ini antioksidan yang dipelajari adalah senyawa tunggal, belum banyak kajian antioksidan kompleks yang menggabungkan dua atau tiga senyawa, sehingga mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Menurut Pham-Huy (2008), radikal bebas dan antioksidan diproduksi dari metabolisme sel normal atau dari luar tubuh, ketika radikal bebas dalam jumlah yang berlebih akan menimbulkan penyakit kronis dan *degenerative* seperti kanker, kekacauan autoimun, penuaan, rheumatoid arthritis, kardiovaskuler dan penyakit *neurodegenerative*.

Mekanisme senyawa kimia ketika bekerja dalam sistem biologi tidak hanya bekerja berdasarkan hukum-hukum atau reaksi kimia tetapi juga melibatkan sistem energi dengan kerja hukum-hukum fisika, seperti misalnya aspek medan gaya magnetik maupun transfer-transfer energi. Mekanisme terakhir inilah yang kurang mendapatkan perhatian dalam mendiskusikan sistem kerja metabolisme dalam tubuh.

Peristiwa seperti ini dapat dilihat pada *textbook* terakhir maupun artikel *review* tentang sistem energi dalam proses metabolisme. Menurut Gruebele & Thirumalai (2013), Skala kimia fisika mampu melampaui interaksi molekul-molekul, yaitu struktur, termodinamika, dan dinamika dalam sel. Sel hidup adalah hubungan antara tingkat molekular, dan tingkat sistem yang telah banyak digambarkan di biologi.

Pelibatan perspektif berfikir dalam aspek magnetik dalam setiap material yang berinteraksi dengan sistem biologis akan memberikan peluang jalan pikiran yang berbeda, untuk dipertimbangkan sebagai cara mengefektifkan teknologi peluruhan radikal bebas, mengingat radikal bebas adalah peristiwa dalam skala atomik akibat dari adanya atom-atom yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Upaya peluruhan radikal bebas harus dipikirkan secara perspektif fisika atau tepatnya perspektif magnetik yang terlibat dalam peluruhan radikal bebas. Menurut Scaiano (2013), radikal bebas biasanya mempunyai masa hidup singkat ( $<10^{-9}$  s) dan kerusakan terjadi karena reaksi dengan radikal bebas lain atau bereaksi dengan

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository  
Repository  
Repository  
Repository  
Repository  
Repository

molekul, dalam kasus ini dihasilkan radikal bebas baru. Magnetik dari radikal bebas terkait dengan sisa elektron yang berputar.

Pada penelitian ini digunakan aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* sebagai *scavenger* kompleks. Albumin diperoleh dari putih telur ayam karena mudah di peroleh di masyarakat, murah dan halal. Beberapa aktivitas biologis putih telur adalah sifat antioksidan, aktivitas antimikroba, sifat *anti-adhesive*, imunomodulator, anti-kanker, dan bioavailabilitas nutrisi (Kovacs-Nolan dkk., 2005). Albumin putih telur mempunyai peran yang sangat penting, merupakan *scavenger* radikal bebas dan mampu membentuk kompleks dengan aspirin, *caffeine*, dan vitamin. Selama ini antioksidan digunakan untuk menangkal radikal bebas, pada umumnya dikenal sebagai senyawa tunggal (seperti vitamin C dan E), sedangkan dalam tubuh merupakan aliran elektron yang mengalir secara terus-menerus. Bila antioksidan menyumbangkan elektron, maka akan menjadi radikal baru, oleh karena itu senyawa kompleks dibutuhkan sebagai *scavenger*. Senyawa kompleks tidak akan menjadi radikal bila menyumbangkan elektronnya, karena mempunyai jumlah elektron yang banyak, dan akan merubah karakter radikal dari paramagnetik menjadi diamagnetik. Serta, senyawa kompleks tidak akan tercerca di dalam sistem pencernaan. Menurut Lobo dkk. (2010), antioksidan adalah molekul yang cukup stabil untuk menyumbangkan sebuah elektron ke radikal bebas untuk menetralkasirnya, sehingga mengurangi kapasitas kerusakan. Antioksidan ini menunda atau menghambat kerusakan seluler terutama melalui sifat *scavenging* radikal bebas mereka. Sedangkan pemilihan aspirin dan *caffeine* adalah sebagai antioksidan. Menurut Agyemang-Yeboah & Oppong (2013), *Caffeine* dapat secara efektif menjadi *scavenger* radikal hidroksil melalui reaksi fenton. Aspirin juga mempunyai efek antioksidan (Guerrero dkk., 2004).

Beberapa fungsi albumin putih telur pada kompleks *scavenger* adalah menjadikan senyawa kompleks sehingga efektivitasnya lebih besar, sebagai transportasi aspirin dan *caffeine*, serta adanya enzim lisozim, pendegradasi protein yang menghambat kerja degradasi sistem pencernakan sehingga aspirin dan *caffeine* tidak secara langsung diserap oleh usus. Komponen utama albumin putih telur adalah polipeptida yang mengandung sisi hidrofobik dan hidrofilik. Sifat aspirin yang sulit larut air akan membentuk kompleks pada bagian dalam albumin putih telur yang bersifat hidrofobik dan *caffeine* yang bersifat larut air akan membentuk kompleks pada bagian luar albumin putih telur yang bersifat hidrofilik, pembentukan kompleks ini

terjadi saat ketiga senyawa tersebut bergabung. Menurut Giapo (2013), protein putih telur terdiri dari asam amino hidrofilik dan hidrofobik, ketika protein putih telur melingkar menjadi bentuk yang melingkar dengan air, asam amino hidrofobik berada di tengah dan asam amino hidrofilik berada di bagian luar yang paling dekat dengan air.

Kompleks yang sudah diaplikasikan kepada banyak relawan yang sakit adalah kompleks aspirin-albumin putih telur-kopi (kopi telur) untuk demam berdarah, batu ginjal, diabetes melitus, kolesterol, bengkak, pusing, flu dan penyakit lain. Menurut data Tim Uji Pestisida Jurusan Biologi FMIPA UNIBRAW (2013) tentang gabungan aspirin-albumin-kopi dan kopi (aspirin-kopi) yang diperlakukan subkronis pada tikus percobaan: (1) Pemberian kopi telur dan kopi dapat menurunkan rata-rata LDL-C pada serum darah tikus, (2) Pemberian kopi telur dan kopi tidak berpengaruh terhadap nilai rata-rata Ureum/BUN pada serum darah tikus, (3) Pemberian kopi dapat menurunkan nilai rata-rata kreatinin pada serum darah tikus, (4) Pemberian kopi telur dan kopi selama 3 bulan dapat meningkatkan kematian sel ginjal 4,41% dan 6,9%, (5) Pemberian kopi telur dan kopi tidak menyebabkan terbentuknya deposit kalsium pada jaringan ginjal. Berdasarkan hasil analisis uji mikrobiologi (Laboratorium Mikrobiologi, 2013), aspirin-kopi mampu memberikan hambatan *E. coli*, tetapi tidak semua bakteri, *E. coli* 100% daya hambat 24,61 ( $\text{mm}^2$ ), *E. coli* 90% daya hambat 5,825 ( $\text{mm}^2$ ), *E. coli* 80% daya hambat 2,443 ( $\text{mm}^2$ ), *E. coli* 70% daya hambat 1,847 ( $\text{mm}^2$ ), *E. coli* 60% daya hambat 0,104 ( $\text{mm}^2$ ), *E. coli* 50% daya hambat 0 ( $\text{mm}^2$ ), *Salmonella* daya hambat 0 ( $\text{mm}^2$ ), *Staphylococcus aureus* daya hambat 0 ( $\text{mm}^2$ ), *Leuconostoc* daya hambat ( $\text{mm}^2$ ).

Pada penelitian ini menggunakan sampel tanpa *freeze-drying* dan *freeze-drying* atau dilakukan pendinginan dengan suhu rendah (-70 °C), dari perlakuan ini diharapkan akan terjadi perubahan struktur dan peningkatan kekuatan magnetik dari ketiga senyawa. Menurut Nireesha dkk. (2013), *freeze-drying* atau *lyophilization* adalah proses pembekuan air yang ada di dalam sampel, pada awalnya dengan sublimasi (pengeringan pertama), kemudian desorpsi (pengeringan kedua). Menurut Choi dkk. (2010), proses pembekuan dapat memecah menjadi nanopartikel selama tahap *freeze-drying*.

Kompleks aspirin-albumin putih telur-*caffeine* mempunyai kemampuan sebagai *scavenger* seperti *Superoxide Dismutase* (SOD) dan katalase, yang akan dibuktikan dengan permodelan secara *in silico* menggunakan software khusus di komputer.

Dengan harapan mendapatkan gambaran konformasi tiga dimensi dari aspirin-albumin putih telur-*caffeine* setelah terjadi kompleks. Selain itu juga dibuktikan dengan ESR (*Electron Spin Resonance*), FTIR (*Fourier Transform Infrared*) serta pengukuran viskositas dengan viskometer. ESR digunakan untuk mengetahui pola *scavenger* kompleks yang mewakili senyawa sintetik aspirin dan senyawa alami *caffeine* dan albumin putih telur. Menurut Xu dkk. (2012), dalam sistem biologi yang terdiri atas komponen kompleks sehingga membuat karakter magnetik dalam ESR tidak dapat dengan mudah diamati. Selain bersifat kompleks sistem biologi atau senyawa-senyawa yang berasal dari sistem biologi umumnya bersifat dinamis, untuk mengatasi hal ini penggunaan ESR memerlukan teknik *spin trapping*. Radikal bebas akan bereaksi dengan *spin-trapping agents* (senyawa nitrone atau nitroso) untuk membentuk *spin-trapping* radikal yang lebih stabil secara langsung terdeteksi oleh ESR. Sedangkan FTIR berfungsi untuk mengetahui gugus fungsi dari aspirin, albumin putih telur, *caffeine* dan bila ketiganya membentuk kompleks. Menurut Intertek Laboratory (2014), FTIR adalah instrument analitik yang efektif untuk mendeteksi gugus fungsi dan karakterisasi ikatan kovalen.

Secara terpisah penelitian karakterisasi pola ESR dan FTIR pada aspirin, *caffeine* dan albumin pernah dilakukan, namun karakter mereka dalam bentuk kompleks multi komponen belum pernah ada. Di sinilah titik penting masalah ini karena secara prinsip sistem biologi tidak mengenal bentuk-bentuk senyawa tunggal dalam pelaksanaan proses hidup. Atas dasar pemikiran dan konsep bahwa aspirin dan *caffeine* adalah peluruh radikal bebas maka ke dua jenis bahan kimia tersebut tidak hanya sekedar penghilang *symptom* melainkan juga memperbaiki peluruhan radikal bebas yang berlebih di dalam tubuh. Beberapa penelitian mencoba menggabungkan *caffeine* dan aspirin. Menurut McDonald (2011), kombinasi *caffeine* dan aspirin tersebut menunjukkan sangat efektif mengobati sakit kepala dan migrain.

Kompleks aspirin-albumin putih telur-*caffeine* berpotensi untuk menjadi obat yang dapat memperbaiki kualitas hidup. Secara umum *scavenger* alamiah berbentuk molekul, protein kompleks, untuk itu ingin dikaji lebih dalam menangkal radikal bebas dalam tubuh. Formulasi aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* secara bersamaan sebagai *scavenger* merupakan langkah yang tepat untuk meredakan sakit dengan cara yang lebih baik daripada penggunaan aspirin/*caffeine*/albumin putih telur secara terpisah.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat diketahui permasalahan yang ingin dibahas dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah aspirin dan *caffeine* dapat mengubah struktur ovalbumin melalui analisis RMSD?
2. Apakah ovalbumin dan kompleks mengalami perubahan struktur dengan perlakuan suhu melalui analisis RMSD?
3. Apakah senyawa kompleks mempunyai kemampuan sebagai *scavenger* radikal bebas yang lebih efektif daripada antioksidan tunggal?
4. Gugus fungsi apa saja yang terdapat pada aspirin, albumin putih telur, *caffeine* dan bila ketiganya membentuk kompleks?

5. Apakah terjadi perbedaan nilai viskositas pada albumin ketika ditambahkan masing-masing senyawa yang berfungsi sebagai *scavenger*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Untuk mendeskripsikan perubahan struktur ovalbumin setelah mengikat aspirin dan *caffeine* melalui analisis RMSD
2. Untuk melihat perubahan struktur kompleks dengan perlakuan suhu dengan analisis RMSD
3. Untuk mengetahui kemampuan senyawa kompleks sebagai *scavenger* radikal bebas dibandingkan senyawa tunggalnya
4. Untuk mengetahui gugus fungsi apa saja yang terdapat pada aspirin, albumin putih telur, *caffeine* dan bila ketiganya membentuk kompleks?
5. Untuk mengetahui nilai viskositas albumin ketika ditambahkan masing-masing senyawa.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah mengetahui konsep baru mengontrol sistem energi dalam tubuh yang sakit. Selain itu manfaat dari penelitian ini adalah dapat digunakan untuk *design* obat berbagai macam penyakit yang lebih efektif dan praktis dari gabungan aspirin, albumin putih telur dan *caffeine*.

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### **2.1 Sistem Peluruh Radikal Bebas dan Fisiologi Sel**

Dalam sel, salah satu bentuk energi adalah aliran elektron yang berpindah dari satu senyawa ke senyawa lain (antioksidan). Sistem ini terdapat di semua bagian dan merupakan aktivitas metabolism. Managemen radikal bebas dilakukan oleh protein yang berperan sebagai *scavenger*, sebagai contoh SOD, katalase dan albumin. Dalam keadaan patologis dan kelelahan, akan mengalami penumpukan radikal bebas pada sel, sehingga diperlukan peluruh radikal bebas, yang dapat menerima/ memberikan elektron.

#### **2.1.1 Radikal Bebas**

Sebuah molekul terdiri dari atom-atom yang paling stabil dalam keadaan dasar. Sebuah atom terdiri dari sebuah inti yang sangat kecil, bermuatan positif yang dikelilingi oleh awan elektron bermuatan negatif. Inti atom pada dasarnya terdiri dari proton dan neutron. Proton bermuatan positif dan neutron netral secara elektrik. Jumlah proton yang menentukan jumlah atom yang tidak dapat diubah dan sama dengan jumlah elektron dalam bentuk atom yang stabil. Setiap partikel pada inti berputar pada dua arah: pada porosnya dan di sekitar pusat inti. Berputar pada porosnya dari sebuah partikel disebut sebagai *spinning*. Jika ada partikel yang berrotasi dari kanan ke kiri (berlawanan arah jarum jam), yang didefinisikan sebagai *spin-up*. Jika partikel berputar dari kiri ke kanan (searah jarum jam), yang didefinisikan sebagai *spin-down*. Elektron di setiap orbital harus dipasangkan dan elektron yang berpasangan ini harus berputar ke arah yang berlawanan. Ini disebut bentuk stabil dari sebuah atom ketika setiap elektron dalam orbital terluar dari sebuah atom elektron berputar berkebalikan arah (Pala & Tabakcioglu, 2007).

Radikal bebas adalah atom atau kelompok atom yang berisi elektron tidak berpasangan pada orbitalnya dan dapat terbentuk ketika oksigen berinteraksi dengan molekul tertentu. Radikal yang sudah terbentuk sangat reaktif dan memulai reaksi berantai. Bahaya radikal bebas berasal dari kerusakan ketika bereaksi dengan komponen seluler penting seperti *deoxyribonucleic acid* (DNA) atau membran sel. Sel akan berfungsi buruk atau mati bila kondisi ini muncul. Sistem enzim dalam tubuh

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository  
Repository  
Repository  
Repository  
Repository

yang menetralkan dan yang menghalangi tubuh dari kerusakan radikal bebas disebut antioksidan (Pala & Tabakcioglu, 2007).

Molekul dengan jumlah elektron genap biasanya mempunyai jumlah elektron yang sama dengan berputar ke atas (atau utara) dan berputar turun (atau selatan).

Ketika masing-masing elektron dilihat sebagai magnet, magnet ini sepenuhnya seimbang pada molekul. Keseimbangan tersebut tidak dapat dicapai pada radikal bebas karena mereka berisi elektron dengan jumlah ganjil (Scaiano, 2013).

Radikal bebas dan antioksidan diproduksi dari metabolisme sel normal atau dari luar tubuh. Radikal bebas dalam jumlah yang berlebih akan menimbulkan penyakit kronis dan *degenerative* seperti kanker, kekacauan autoimun, penuaan, rheumatoid arthritis, kardiovaskuler dan penyakit *neurodegenerative* (Pham-Huy dkk., 2008).

Radikal bebas muncul selama metabolisme normal, yaitu diproduksi selama aktivitas imun, dan terpapar oleh faktor lingkungan seperti polutan, rokok dan sinar matahari (Honzel dkk., 2008). Radikal bebas dapat dihasilkan pada sistem biologi dengan banyak cara seperti (Pala & Tabakcioglu, 2007):

1. Pemecahan ikatan kovalen dengan cara homolitik
2. Kehilangan sebuah elektron
3. Penambahan sebuah elektron

Ketika sebuah radikal bebas terbentuk selama sebuah reaksi kimia dalam tubuh, radikal ini mencoba untuk membentuk kondisi stabil. Radikal bebas mempunyai hidup yang sangat singkat ( $10^{-10}$  detik) tetapi proses ini berlanjut sebagai reaksi berantai.

Ada banyak tipe dari radikal bebas yang dapat terbentuk di dalam tubuh. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) adalah komponen utama dari sistem radikal bebas. Kecuali dua jenis radikal bebas ini: atom hidrogen, transisi logam berat (seperti besi, tembaga, seng dan mangan), klorin, obat-obatan, radiasi ionisasi, limbah lingkungan (seperti CO, asbes, ozon, pelarut, dan lain-lain) yang berperan sebagai sumber radikal bebas. ROS adalah radikal bebas yang pertama kali ditemukan pada material biologi. ROS seperti superokside ( $O_2^{\cdot+}$ ), hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) yang berasal dari molekul oksigen selama metabolism normal oksigen (Pala & Tabakcioglu, 2007).

Sistem biologi terus menerus terpapar oksidan endogenus dan eksogen (Tabel 1) (kedua dari radikal bebas-spesies dengan elektron tidak berpasangan-dan dua elektron oksidan) (Davies, 2016).



Tabel. 1 Contoh faktor endogenus dan eksogenus yang menghasilkan pembentukan oksidan (Davies, 2016).

Endogenous	Eksogenus
- Rantai transport elektron (mitokondria, retikulum endoplasma, plasma membran)	- Radiasi (energi tinggi, UV, cahaya tampak+ sensitizer, termal, ultrasound)
- Protein hemoglobin/ reaksi enzim (contohnya hemoglobin, myoglobin, sitokrom seperti sitokrom P <sub>450</sub> )	- Metabolisme hidrokarbon diklorinasi, obat-obatan, senyawa nitro, parasetamol, etanol
- Peroksidase	- Nitrogen oksida (NO <sub>x</sub> )
- Nitric oxide synthases (NOS)	- Partikulat (misalnya partikel diesel)
- NADPH oxidase (NO <sub>x</sub> )	- Serat mineral dan debu (contohnya asbestos)
- Xanthine oxidase	- Ozon
- Lipoxygenase	- Sulfur oxides (SO <sub>x</sub> )
- Prostaglandin sintase	- Bahan makanan teroksidasi
- Autooksidasi glukosa, tiol, katekolamin, ion logam	- Proses pembakaran (contohnya merokok)
	- Kelebihan ion logam (contohnya Fe, Cu)

Protein adalah target utama oksidasi, tingkat kerusakan target biologis tergantung pada kisaran faktor termasuk (Davies, 2016):

- (1) konsentrasi target tertentu,
- (2) konstanta laju reaksi dari oksidan dengan target
- (3) lokasi dari target relatif terhadap oksidan
- (4) terjadinya peristiwa kerusakan sekunder, meliputi reaksi berantai
- (5) reaksi transfer intra- dan antar-molekul,
- (6) kemungkinan dan tingkat perbaikan, dan reaksi oksidan *scavenging*

Radikal bebas umumnya terlibat dalam reaksi berantai, serangkaian reaksi menyebabkan regenerasi radikal yang dapat memulai siklus reaksi baru. Reaksi radikal bebas membutuhkan tiga tahap yang berbeda (Sen dkk., 2010):

1. Tahap inisiasi: pembentukan radikal
2. Tahap propagasi: pada langkah ini diperlukan radikal bebas digenerasi berulang kali sebagai hasil reaksi berantai, yang akan mengambil reaksi sampai selesai.

3. Tahap penyebaran: pengrusakan dari radikal.

Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) telah banyak diterapkan untuk memperkirakan aktivitas antioksidan dalam beberapa tahun terakhir. Radikal bebas DPPH yang stabil berdasarkan delokalisasi elektron secara keseluruhan, sehingga molekul tidak dimerasi, seperti halnya dengan sebagian besar radikal bebas lainnya. Delokalisasi juga menimbulkan warna ungu tua, ditandai dengan absorpsi *band* pada larutan etanol yang berpusat sekitar 250 nm. Ketika larutan DPPH dicampur dengan zat yang dapat menyumbangkan atom hidrogen, maka menjadi berkurang dengan hilangnya warna ungu ini (meskipun diharapkan menjadi warna kuning pucat dari kelompok picryl yang tersisa). Mewakili radikal DPPH oleh Z $\cdot$  dan molekul donor oleh AH, reaksi utamanya adalah dimana ZH adalah bentuk tereduksi dan A $\cdot$  adalah radikal bebas yang diproduksi pada langkah pertama ini. Radikal yang terakhir ini akan menjalani reaksi lebih lanjut yang mengontrol keseluruhan stoikiometri, yaitu jumlah molekul DPPH dikurangi (*decolorized*) oleh satu molekul reduktan (Molyneux, 2003).

### **2.1.2 Peluruh Radikal Bebas**

Antioksidan adalah zat yang mampu menghentikan dan mencegah radikal bebas untuk menyebabkan kerusakan sel. Antioksidan menunda atau menghambat kerusakan oksidatif pada molekul sasaran. Molekul antioksidan dapat mencapai radikal bebas tunggal dan dapat menetralkannya dengan mendonasikan satu elektron. Antioksidan mencegah kerusakan sel dan jaringan. Berbagai komponen yang dapat melawan radikal bebas secara endogenus dan eksogenus adalah (Sen dkk., 2010):

- Antioksidan endogenus enzimatis

- Antioksidan non enzim, metabolism dan nutrisi

- Protein pengikat logam seperti ferritin, lactoferrin, albumin dan ceruloplasmin

- Fitokonstituen dan fitonutrien

Dalam keadaan normal, pembentukan dan reaksi spesies dibatasi oleh sistem pertahanan di dalam sel dan organisme. Ini termasuk *low-molecular-mass-scavenger* (contohnya asam askorbik, tiol, quinol, tokoferol, karotenoid, polifenol, urate), enzim yang menghilangkan oksidan secara langsung (contohnya superokida dismutase) atau precursor mereka (contohnya peroksiredoksin, glutation peroksidase dan katalase yang menghilangkan peroksida), dan sistem enzim yang memperbaiki kerusakan (metionin sulfoksida reduktase, disulfida reduktase/ isomerase, sulfiredoksin) atau

Repository Universitas Brawijaya menghilangkan materi yang rusak (contohnya proteosom, lisosom, protease, fosfolipase, enzim perbaikan DNA) (Davies, 2016).

Antioksidan alami dan buatan secara luas digunakan pada pengobatan modern. Beberapa antioxidant terbukti menjadi *geroprotector* yang efisien, yaitu memperpanjang masa hidup hewan laboratorium bila ditambahkan ke makan atau air minum secara teratur. Secara *in vitro*, antioksidan menghambat rantai reaksi oksidasi radikal bebas, menghasilkan oksidasi asam lemak, lemak makanan, dan lain-lain. Namun, efisiensi mereka sebagai scavenger radikal bebas oksigen pada sel dan jaringan dapat diabaikan dibandingkan dengan enzim antioksidan alami (Shalaby & Shanab, 2013).

Transfer hidrogen dari antioksidan pada radikal peroksi atau alkil dari makanan secara termodinamik lebih baik ketika energi ikatan berdisosiasi untuk O-H pada antioksidan rendah. Pelarut polar menurunkan aktivitas radikal *scavenging* dari antioksidan karena ikatan hidrogen antarmolekul antara oksigen atau nitrogen dalam pelarut polar dan gugus OH dalam antioksidan fenolik. Semakin rendah energi disosiasi ikatan untuk kelompok antioksidan O-H, semakin stabil radikal antioksidan. Antioksidan dengan energi disosiasi ikatan rendah adalah donor hidrogen yang lebih efisien dan antioksidan yang lebih baik. Kekuatan ikatan O-H dari antioksidan fenolik dipengaruhi oleh substitusi hidrogen dalam cincin benzena. Aktivitas antioksidan dari antioksidan fenolik tergantung pada keseimbangan antara efek donor elektron dari substituent dan kerumunan sterik di sekitar gugus OH fenolik yang terkait dengan sisi substituen. Setiap substituen mendestabilisasi antioksidan fenolik *ground-state* antioksidan fenolik, dan/ atau menstabilkan bentuk radikal fenoksi, mengurangi kekuatan ikatan O-H. Substituen seperti alkil atau kelompok hidroksil kedua meningkatkan stabilisasi radikal antioksidan dan meningkatkan aktivitas *scavenging* radikal (Choe & Min, 2009).

Beberapa antioksidan menyumbangkan elektron untuk menstabilkan dan menetralkan radikal bebas yang berbahaya. Antioksidan lainnya bekerja melawan molekul yang membentuk radikal bebas, menghancurnyanya sebelum memulai efek domino yang mengarah ke kerusakan oksidatif. Antioksidan bekerja untuk mengontrol tingkat radikal bebas sebelum melakukan kerusakan oksidatif pada tubuh. Misalnya, enzim tertentu dalam tubuh, seperti superoksid dismutase, bekerja dengan kimia lain untuk mengubah radikal bebas menjadi molekul tidak berbahaya (Lamina dkk., 2013).

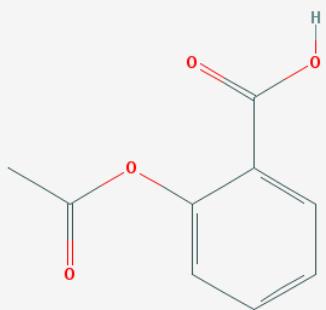
Antioksidan berperan sebagai *scavenger* radikal, donor hidrogen, decomposer peroksida, *singlet oxygen quencher*, inhibitor enzim, synergist, dan *metal-chelating agent*. Antioksidan enzimatik dan nonenzymatic keduanya berada pada lingkungan intraseluler dan ekstraseluler untuk detoksifikasi ROS. Dua prinsip mekanisme dari aksi antioksidan. Pertama mekanisme rantai pemecahan dengan antioksidan primer menyumbangkan elektron kepada radikal bebas yang ada pada sistem. Mekanisme kedua meliputi penghilangan inisiator ROS atau antioksidan sekunder oleh *quenching chain-initiating catalyst*. Antioksidan dapat menggunakan efeknya pada sistem biologis dengan mekanisme yang berbeda termasuk donor elektron, *chelation* ion logam, ko-antioksidan, atau dengan regulasi ekspresi gen (Lobo dkk., 2010).

Tubuh manusia memiliki pertahanan antioksidan kompleks yang meliputi enzim antioksidan superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx), dan catalase (CAT). Antioksidan tersebut memblokir inisiasi reaksi berantai radikal bebas. Komponen antioksidan nonenzim terdiri dari molekul seperti gluthathione, alpha-tocopherol, asam askorbat dan beta-karoten yang bereaksi dengan spesies oksigen aktif dan dengan demikian mencegah penyebaran reaksi berantai radikal bebas (Rukmini dkk., 2004).

SOD terletak pada sitosol dan mitokondria, secara katalis mengubah  $O_2^-$  menjadi oksigen dan  $H_2O_2$  dengan adanya kofaktor ion logam seperti tembaga (Cu), seng (Zn), atau mangan (Mn) (Nimse & Pal, 2015). SOD menghilangkan  $O_2^-$  dengan mengubahnya menjadi hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan  $O_2$ .  $H_2O_2$  sendiri bisa sangat beracun bagi sel. Misalnya, inkubasi sel dengan  $H_2O_2$  menyebabkan kerusakan DNA, gangguan membran, dan pelepasan ion  $Ca^{2+}$  dalam sel, yang mengarah ke aktivasi prosease dan nuklease yang bergantung pada  $Ca^{2+}$ . Beberapa kerusakan ini dapat dimediasi oleh reaksi  $H_2O_2$  dengan  $O_2$  dengan adanya ion besi atau tembaga, untuk membentuk radikal yang sangat reaktif, salah satunya adalah  $\bullet OH$ . SOD bekerja bersama dengan dua enzim, katalase dan glutathione peroxidase yang menghilangkan  $H_2O_2$  dalam sel manusia (Halliwell & Sacramento, 1991).

### **2.1.3 Aspirin (*Acetylsalicylic acid*)**

Aspirin tidak berbau dan berupa serbuk putih, melting point 135 °C (Murtaza dkk., 2014). Aspirin mempunyai rumus molekul  $C_9H_8O_2$ , berat molekul 180,15742 g/mol,  $pK_a = 3,49$  pada 25 °C, dan mempunyai struktur (Gambar 1) sebagai berikut (Pubchem, 2015):



(A)



(B)

Gambar 1. Struktur kimia aspirin 2D (A), dan struktur kimia aspirin 3D (B), warna merah merupakan atom O (Pubchem, 2015).

Pada Aspirin atom oksigen mempunyai kelistrikan negatif lebih besar, yang merupakan daya tarik bagi elektron. Oksigen juga mempunyai ikatan ganda yang menarik elektron lebih banyak daripada ikatan tunggal (Jones, 2003). Aspirin adalah kelompok senyawa yang disebut *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs).

Aspirin digunakan pada pencegahan struk awal atau berulang. Aspirin juga dikenal sebagai *acetylsalicylic acid*, adalah sebuah obat *salicylate*, sering digunakan sebagai analgesik untuk meredakan sakit dan nyeri, sebagai antipiretik untuk mengurangi demam, dan sebagai obat anti inflamasi. Aspirin pertama kali diisolasi oleh Felix Hoffmann (Sneader, 2000; Schror, 2009). Aspirin dengan dosis rendah secara langsung dapat diberikan setelah serangan jantung untuk menurunkan resiko serangan jantung dari kematian jaringan jantung (Krumholz dkk., 1995; Algra & Rothwell, 2012). Aspirin efektif mencegah tipe kanker tertentu, khususnya kanker kolorektal (Gomes, 1998; Rothwell dkk., 2012; Macdonals, 2002). Pada tahun terakhir menunjukkan bahwa Aspirin dengan dosis tinggi (2 mM) menurunkan pertumbuhan tumor secara *in vivo* maupun *in vitro* (Gomes, 1998). Aspirin berfungsi sebagai antioksidan dengan kemampuannya terhadap radikal, efektif pada penurunan resiko beberapa kanker, termasuk kolon dan paru-paru (Nafisi dkk., 2011).

Aspirin adalah agen yang banyak digunakan untuk terapi penyakit inflamasi, serta untuk pencegahan kejadian vaskuler seperti infark miokard dan stroke. Efek protektif ini sebagian besar disebabkan oleh penghambatan platelet dan efek anti-inflamasi. Baru-baru ini menunjukkan bahwa aspirin mempengaruhi ekspresi dari

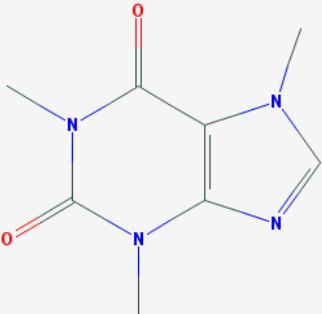
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

peroxisome proliferator-activated, reseptor nuklir yang terlibat dalam pengaturan metabolisme lipid (Tancevski dkk., 2006).

#### 2.1.4 Caffeine

Rumus *Caffeine* adalah  $C_8H_{10}N_4O_2$ , berat molekul 194.1906,  $pK_a = 10.4$  pada 40 °C, struktur kimia *Caffeine* ditunjukkan Gambar 2 (Pubchem, 2015):



(A)



(B)

Gambar 2. Struktur kimia *Caffeine* 2D (A), dan struktur kimia caffeine 3D (B). Warna merah merupakan atom O sedangkan warna biru merupakan atom N (Pubchem, 2015)

*Caffeine* terdapat pada berbagai minuman (kopi, teh, minuman energi) dan beberapa makanan (cokelat dan makanan pencuci mulut); *caffeine* juga sebagai obat yang digunakan sebagai stimulan, atau ditambahkan ke formulasi analgesik (Sawynok, 2010). *Caffeine* yang secara umum dikonsumsi oleh manusia diekstrak dari tanaman biji kopi dan semak daun teh, maupun dari berbagai makanan dan minuman yang mengandung produk yang berasal dari kacang kola (Kasimala & Kasimala, 2011).

*Caffeine* secara luas dikonsumsi karena efek stimulan sistem saraf pusat seperti peningkatan kewaspadaan dan mengurangi kelelahan. *Caffeine* mempunyai efek yang bermanfaat pada kinerja mental dan fisik. Fungsi kognitif meningkat, meningkatkan memori dan penalaran, peningkatan kewaspadaan, merupakan beberapa manfaat yang dapat dilihat dari asupan *caffeine* dalam hal kinerja mental. Sedangkan efek asupan *caffeine* pada kinerja fisik adalah daya tahan otot meningkat, metabolisme anaerobik meningkat dan peningkatan waktu kinerja (International Food Information Council Foundation, 2013).

Efek *caffeine* terhadap rasa sakit menjadi perhatian karena beberapa sebab (Sawynok, 2011):

- (1) *Caffeine* terdapat dalam formulasi analgesik dan menunjukkan sifat adjuvant, meningkatkan efek analgesik dari konstituen utama.
- (2) Penggunaan *caffeine* kronis, menghilangkan sakit kepala; di sisi lain, kebiasaan mengkonsumsi *caffeine* yang berlebih dikaitkan dengan *generation of headaches*.
- (3) Pada studi praklinik, *caffeine* dengan dosis rendah dibandingkan pada analgesik adjuvant, akan memblokir *antinociception*, dan diet *caffeine* dapat mengganggu tindakan analgesik agen.

*Caffeine* telah dilaporkan sebagai *scavenger hydroxyl radikal* dengan konsentrasi milimolar dalam penelitian ESR dengan spin trap. Namun, belum terbukti apakah *caffeine* pada konsentrasi milimolar relevan memiliki kemampuan antioksidan. Pada penelitian tersebut menggambarkan kapasitas penyerapan oksigen-radikal (ORAC) dari *caffeine* dan metabolitnya terhadap radikal peroxyl dibandingkan dengan antioksidan terkenal Trolox, asam askorbat dan uric acid (Lee, 2000).

### 2.1.5 Albumin Putih Telur

Putih telur atau albumin, 60% dari berat total telur, air dan protein yang menjadi unsur utama. Protein putih telur meliputi ovalbumin sebagai protein utama, kemudian ovotransferrin dan ovomucoid. Protein putih telur meliputi ovomucin, yang bertanggungjawab untuk viskositas albumin, lysozym, avidin, cystatin, ovoinhibitor dan ovomacroglobulin (ovastatin). Putih telur juga mengandung sejumlah protein dengan ditunjukkan aktivitas antimikroba, yang berperan sebagai bagian dari sistem pertahanan telur. Efek antimikrobial ini mungkin dikaitkan dengan beberapa mekanisme, meliputi sel lisis bakteri, mengikat metal dan mengikat vitamin. Hidrolisis enzimatik dari protein putih telur mentah dengan pepsin menghasilkan produksi peptida dengan aktivitas antioksidan. Peptida Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu, yang sebelumnya ditunjukkan dengan aktivitas angiotensin *I-converting enzyme* (ACE-inhibitory), juga ditunjukkan dengan tingginya aktivitas *radical-scavenging* (Kovacs-Nolan dkk., 2005).

Kandungan asam amino pada protein utama Albumin adalah Alanin, Valine, Leucine, Isoleucine, Proline, Phenylalanine, Tryptophan, Methionine, Tyrosine, Glycine, Serine, Threonine, Cysteine, Amide N, Asparagine, Glutamine, Arginine, Histidin, Lysine, Aspartic acid, Glutamic acid (Messier, 1991). Asam amino dibagi

menjadi asam amino hidrofobik dan hidrofilik, yang tergolong asam amino hidrofobik adalah Alanin, Valine, Leucine, Isoleucine, Phenylalanine, Tryptophan, Methionine, Tyrosine. Asam amino Hidrofilik adalah Serine, Threonine, Arginine, Histidin, Lysine, Aspartic Acid, Glutamic Acid (Lodish dkk, 2004).

Selain nilai gizi, komponen telur memiliki berbagai aktivitas biologis yang dapat memberikan manfaat kesehatan yang penting. Telur adalah sistem biologis lengkap yang dirancang untuk memelihara dan melindungi pertumbuhan embrio dari berbagai invasi patogen. Kulit telur dengan membran dan protein putih telur memiliki mekanisme pertahanan fisik dan biologis seperti viskositas, pH, sifat antimikbia, dll. Banyak senyawa pada putih (Tabel 2) dan kuning telur yang menunjukkan sifat antioksidan, selain itu telur dapat diperkaya dengan antioksidan (yaitu karotenoid, vitamin E, selenium dan yodium) melalui manipulasi pakan unggas (Nimalaratne & Wu, 2015).

Tabel 2. Antioksidan pada putih telur

Nama Komponen	% dari protein putih telur	Mekanisme Aksi
Ovalbumin	54	Kelompok Free thiol (SH) pada ovalbumin meregulasi status redoks dan mengikat ion logam, sehingga menggunakan sifat antioksidan. Meningkatkan aktivitas antioksidan terkonjugasi dengan sakarida.
Ovotransferrin	12	Memiliki aktivitas <i>scavenging</i> seperti SOD superokksida karena kemampuannya <i>cleaving</i> logam
Ovomucin	3,5	Menghambat stress oksidatif yang diinduksi $H_2O_2$ pada ginjal embrio manusia
Lysozyme	3,4	Menekan reactive oxygen species (ROS) dan gen stress oksidatif
Cystatin	0,05	Memodulasi sintesis dan pelepasan NO,

produksi dan dengan demikian memainkan peran dalam jalur antioksidan seluler

## 2.2 Analisis Pendukung untuk Mengetahui Karakter Senyawa Kompleks

### 2.2.1 Kajian Senyawa Kompleks Melalui Komputer Modeling (*In Silico*)

Dalam lima puluh tahun terakhir, penggunaan simulasi komputer dalam bidang penelitian ilmiah telah sering dilakukan. Simulasi telah digunakan untuk membuat prediksi, untuk tujuan pelatihan, untuk pengembangan dan memverifikasi teori ilmial khususnya, teori-teori non-linear, sistem dinamis, dengan cara menciptakan interdisiplin ilmiah baru untuk mempelajari sistem yang kompleks. Istilah *in silico* diciptakan pada akhir 1980 an, untuk merujuk pada eksperimen “virtual” yang hanya ada di dalam komputer. Ini melengkapi ketentuan *in vivo* dan *in vitro*, karakterisasi percobaan yang dicapai, masing-masing, dalam organisme hidup dan di luar organisme, dalam lingkungan yang terkendali (Moretti, 2011).

Dalam dua dekade terakhir, penggunaan eksperimen *in silico* telah berkembang pesat di bidang biologi. Pertumbuhan ini telah dipercepat lebih lanjut oleh *Human Genome Project*, yang telah menginspirasi strategi pencatatan semua struktur dan informasi fungsional mengenai berbagai fenomena biologis, sehingga menciptakan kumpulan bioinformatika database terintegrasi, banyak yang tersedia untuk semua orang melalui *world wide web*. Para ahli biologi molekuler sekarang memiliki banyak sekali data elektronik yang disimpan dimana suatu makna biologis harus diberikan. Dengan demikian bioinformatika telah berkembang sebagai suatu disiplin, dengan tujuan untuk menyediakan beberapa alat komputasi yang penting untuk menganalisis genom, dan untuk merumuskan hipotesis baru tentang hubungan evolusioner dan fungsional dari unsur-unsur biologis (Moretti, 2011).

*In silico* farmakologi (juga dikenal sebagai terapi komputasional, farmakologi komputasional) adalah bidang yang berkembang pesat yang secara global mencakup pengembangan teknik untuk menggunakan perangkat lunak untuk menangkap, menganalisis dan mengintegrasikan data biologis dan medis dari berbagai sumber. Lebih khusus lagi, mendefinisikan penggunaan informasi ini dalam pembuatan model komputasi atau simulasi yang dapat digunakan untuk membuat prediksi, menyarankan hipotesis, dan pada akhirnya memberikan penemuan atau kemajuan dalam bidang kedokteran dan terapi (Ekins dkk., 2007).

Molekular *docking* adalah prosedur komputasi yang mencoba memprediksi pengikatan makromolekul nonkovalen atau, lebih sering, dari makromolekul (reseptor) dan molekul kecil (ligan) secara efisien, dimulai dengan struktur *unbound*, struktur yang diperoleh dari simulasi MD, atau permodelan homolog, dll. Tujuannya adalah memprediksi ikatan konformasi dan *binding affinity*. Prediksi pengikatan molekul kecil pada protein adalah sangat penting karena digunakan untuk *screen virtual libraries* dari molekul yang mirip obat untuk mendapat petunjuk, untuk pengembangan obat lebih lanjut. Docking juga dapat digunakan untuk mencoba memprediksi ikatan konformasi dari pengikat yang dikenal, ketika struktur *holo* dalam eksperimen tidak tersedia (Trott & Olson, 2010).

### 2.2.2 *Electron Spin Resonance (ESR)*

*Electron Spin Resonance Spectroscopy* (ESR) juga dikenal sebagai *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) atau *Electron Magnetic resonance* (EMR), ditemukan oleh fisikawan Rusia Zavoisky tahun 1945 (Rieger, 2007). ESR adalah teknik spektroskopi yang mendeteksi atom dengan elektron yang tidak berpasangan meliputi radikal bebas, transisi ion logam, kerusakan pada material dan gerakan molekuler. Prinsip kerja ESR adalah ketika sebuah sistem atom atau molekuler dengan elektron tidak berpasangan dikenakan medan magnet, tingkat energi elektronik dari atom atau molekul akan terbagi menjadi tingkat yang berbeda. Besarnya pemisahan tergantung pada kekuatan medan magnet yang digunakan. Atom dan molekul bergerak dari satu tingkat ke tingkat lain dengan adanya radiasi eksternal dari frekuensi yang sesuai, dari energi yang berbeda diantara tingkat yang terbagi. Medan resonan dan frekuensi terkait dengan faktor  $g$  yaitu  $g = h\nu / (\mu_B B)$  (Makarova, 2011; Wertz & Bolton, 1972).

Aplikasi ESR *Spectroscopy* menurut Rieger (2007) adalah:

1. Penentuan Struktur Elektronik

Paling umum, ESR *spectroscopy* digunakan untuk mendapatkan informasi yang berkaitan dengan struktur elektronik spesies. Nilai medan magnet pada gelombang mikro terserap untuk mengasilkan spektrum ESR dari sampel isotropik, seperti spektrum dari radikal yang secara bebas jatuh pada larutan.

2. Aplikasi Analitik

Intensitas ESR, seperti pada semua bentuk *spectroscopy* lain, tergantung pada jumlah spin ( $N$ ), dapat digunakan secara analitik untuk menentukan konsentrasi spesies paramagnetik. Seperti aplikasi analitik biasanya membutuhkan larutan standart untuk

Repository Universitas Brawijaya membuat skala intensitas kalibrasi. *Spin trap* yang *scavenge* radikal reaktif yang digunakan untuk mendeteksi intermediasi seperti radikal pada mekanisme reaksi pemisahan.

### 3. Penentuan Laju

Pada beberapa kasus, ESR spectra dapat digunakan untuk menentukan laju dari reaksi kimia atau laju dari perubahan konformasi. Beberapa peneliti menggunakan *spin labels* yang terikat membran atau makromolekul biologi untuk mempelajari gerakan dari komponen sel hidup.

#### 2.2.3 Fourier Transform Infrared (FTIR)

FTIR adalah instrument analitik yang efektif untuk mendeteksi gugus fungsi dan karakterisasi ikatan kovalen. FTIR digunakan untuk identifikasi senyawa kimia pada produk konsumen, cat, polimer, pelapis, obat-obatan, makanan dan produk lain. Analisis FTIR membantu memahami material dan produk. Identifikasi ikatan kimia pada sebuah molekul dengan FTIR menghasilkan sebuah spektrum absorpsi infrared.

Spektrum menghasilkan profil sampel, *fingerprint* molekul yang berbeda yang dapat digunakan untuk *screen* dan *scan* sampel untuk banyak komponen yang berbeda. (Intertek Laboratory, 2014).

Teknik FTIR mempunyai keuntungan yang berbeda dari spektrometer dispersif (Settle, 1997) :

- Kecepatan yang lebih baik dan sensitif (keuntungan Felgett). Sebuah spektrum dapat diperoleh secara lengkap selama satu kali *scan* dari pergerakan cermin, sedangkan detektor mengamati semua frakuenzi secara bersamaan.

- Keuntungan Jaquinot. Sisa energi tidak diperlukan pada interferometer karena penyebaran atau penyaringan tidak diperlukan, dan tersedianya energi radiasi, dengan demikian keuntungan utama untuk banyak sampel.

- Rancangan mekanik sederhana. Hanya terdapat satu bagian yang bergerak yaitu cermin gerak.

- Menghilangkan cahaya lain dan kontribusi emisi

- Stasiun data yang kuat. FTIR spektrometer modern biasanya dilengkapi dengan sistem data komputer.

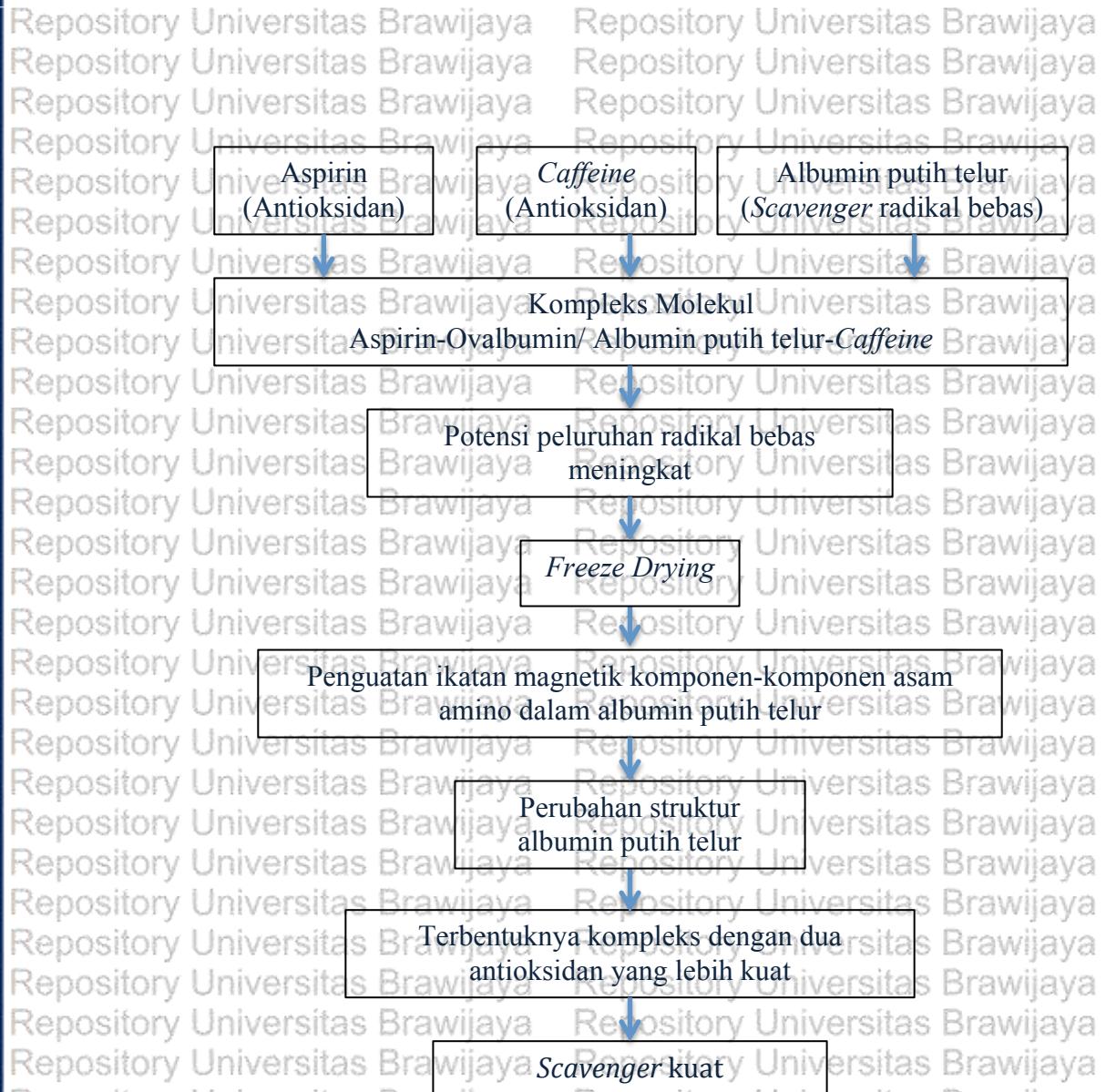


### 2.3 Kerangka Konsep Penelitian

Aspirin merupakan obat yang sering digunakan sebagai antipiretik (menurunkan panas), analgesik (meredakan sakit dan nyeri) dan anti inflamasi. Antipiretik dapat mengontrol homeostatis suhu tubuh sehingga dapat mengontrol disipasi energi.

*Caffeine* diperoleh dari bahan alam, yang merupakan anti inflamasi dan merupakan antioksidan radikal bebas. Albumin putih telur merupakan protein yang memfasilitasi transportasi dan *scavenger* yang mengandung gugus asam amino hidrofobik dan hidrofilik sebagai tempat terjadinya kompleks aspirin yang bersifat hidrofobik dan *caffeine* yang bersifat hidrofilik. Bila terjadi kompleks diantara ke tiga senyawa tersebut akan meningkatkan potensi peluruhan radikal bebas.

Kompleks diperlakukan suhu yang rendah (*freeze-drying*) dengan suhu -70 °C, kompleks kehilangan air menjadi padat dan berpengaruh pada ikatan kimia. Gerak atom pada kompleks menjadi stabil tetapi tidak fungsional, setelah *freeze-drying* terjadi penguatan ikatan elektron komponen-komponen asam amino dalam albumin putih telur. *Freeze-drying* menyebabkan adanya perubahan struktur albumin putih telur karena perubahan ikatan dan posisi atom. Stabilitas struktur kompleks meningkat, yang dapat berfungsi sebagai *scavenger* yang kuat, karena mengikat elektron tapi tidak menjadi radikal (Gambar 3).



Gambar 3. Kerangka konsep penelitian

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokomputasi, Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Laboratorium Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Klinik Griya Bromo, Malang dan Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) Jakarta Selatan. Pada bulan April 2015-

November 2016.

### **3.2 Kerangka Operasional**

Penelitian *in silico* dilakukan untuk melihat interaksi *scavenger* yang meliputi aspirin-ovalbumin-*caffeine*. Sampel yang digunakan pada penelitian laboratorium basah yaitu dengan *freeze-dry* dan tanpa *freeze-dry*. Menurut Muthunkumaran (2007), *Freeze-drying* adalah salah satu metode pengeringan, yang dapat menghasilkan produk yang kering dengan kualitas tinggi. *Freeze-drying* mempunyai dua tahap penting: satu adalah pembekuan dari material dan kemudian dikeringkan dengan *vacuum*. Metode ini mengambil keuntungan dari *triple point* dari air. *Triple point* adalah keadaan dimana zat dalam keadaan yang berbeda-beda seperti padat, air dan uap, dan tetap dalam keseimbangan termodinamika.

Sampel yang sudah berbentuk serbuk (setelah *freeze-drying*) kemudian dilakukan ESR untuk melihat karakterisasi magnetik. Selain ESR juga FTIR untuk melihat gugus fungsi setelah terjadi kompleks dan viscometer untuk melihat viskositas (Gambar 4).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

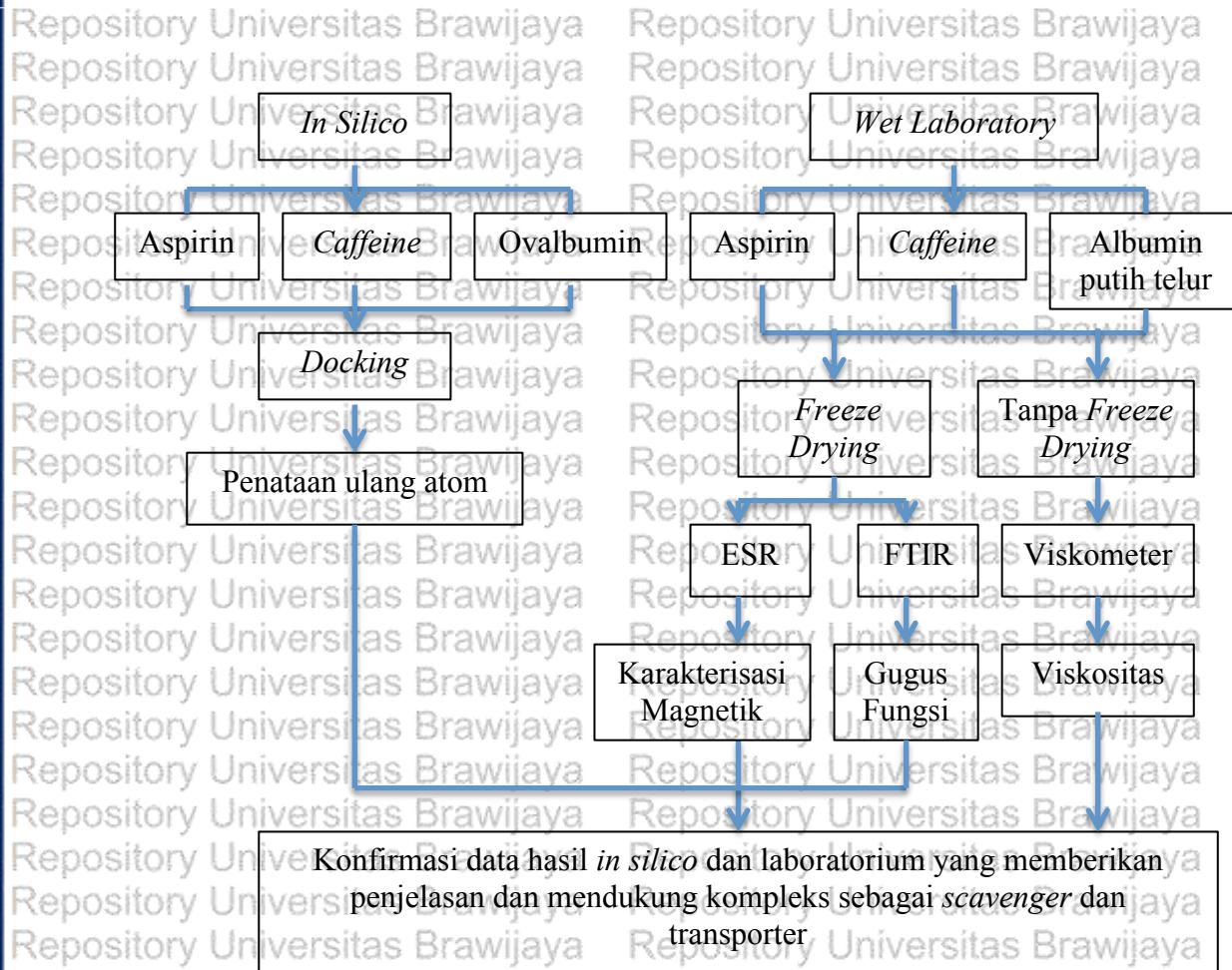
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya



Gambar 4. Kerangka operasional penelitian

### 1.3 Prosedur Penelitian

Analisis *in silico* dilakukan menggunakan *software* komputer untuk melihat interaksi molekul antara aspirin, *caffeine* dan albumin putih telur yang menggunakan ovalbumin, dengan langkah sebagai berikut: (1) Persiapan Struktur Molekul: Struktur molekul aspirin dan *caffeine* dapat diperoleh dari website Pubchem (PubChem, 2006), sedangkan ovalbumin diperoleh dari website National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NCBI, 2006); (2) Docking molekul: Proses *docking* dilakukan satu per satu, langkah pertama aspirin dengan ovalbumin, setelah tergabung kemudian dengan *caffeine* menggunakan program Pyrex (Trott & Olson, 2010); (3) Visualisasi hasil *docking* menggunakan program Pymol (Pymol, 2010); (4) Keberhasilan *docking* dapat dilihat dengan program LigPlot (Wallace dkk., 1995); (5) Interaksi aspirin dan *caffeine* terhadap ovalbumin dapat diamati dengan Ligandscout (Wolber & Langer, 2005). (6) Ovalbumin *Hydrophobicity* menggunakan program Chimera (Pettersen

dkk., 2004); (7) Program Yasara digunakan untuk analisis Root-Mean-Square-Deviation (Krieger dkk., 2004). Sampel yang digunakan pada penelitian laboratorium ini adalah albumin putih telur ayam (*strain*: Isa, umur telur tidak lebih dari 8 hari, yang diambil langsung dari peternakan di daerah Pasuruan), aspirin dan *caffeine* serbuk (Sigma-Aldrich Co.LLC, China). Persiapan yang dilakukan sebelum perlakuan adalah keseluruhan albumin putih telur dikocok memutar ke kiri (berlawanan jarum jam) dengan hati-hati untuk menghindari busa. Sampel dibagi menjadi dua bagian, yaitu tanpa dan diperlakukan *freeze-dry* (CHRIST, ALPHA 1-2 LD Plus, Germany) selama 3 hari, sebelum pengukuran ESR dan FTIR. Perbandingan jumlah sampel untuk ESR dan FTIR adalah aspirin 0,014 gram, albumin putih telur 1 ml dan *caffeine* 0,006 gram. Pengukuran viskositas menggunakan keseluruhan albumin putih telur tanpa *freeze-dry*, dengan perbandingan sampel aspirin 0,083 gram, albumin putih telur 6 ml dan *caffeine* 0,033 gram.

## 1. ESR

Kondisi pengukuran ESR spectrometer (JEOL, JES-RE1X, Japan) yaitu: center field: 335,6 mT; sweep width: 15 mT; field modulation width: 0,5 x 1 mT. Standart yang digunakan dalam pengukuran ESR adalah DPPH (Fluka AG Buchs Sg, Switzerland). Sampel yang digunakan untuk ESR adalah:

- a. Aspirin
- b. Albumin putih telur
- c. *Caffeine*
- d. DPPH
- e. DPPH - Aspirin
- f. DPPH - Albumin putih telur
- g. DPPH - *Caffeine*
- h. DPPH - Kompleks
- i. DPPH - Aspirin - Albumin putih telur
- j. DPPH - *Caffeine* - Albumin putih telur

## 2. FTIR

Repository Universitas Brawijaya  
Repository Universitas Brawijaya  
Kondisi pengukuran FTIR spectrophotometer (SHIMADZU, 8400S, Japan) dengan setting range 400-4000 cm<sup>-1</sup> wave number. Sampel yang digunakan untuk FTIR dengan jumlah 0,0075-0,0085 gram adalah :

- a. Aspirin
- b. *Caffeine*
- c. Albumin putih telur
- d. Aspirin - Albumin putih telur
- e. *Caffeine* - Albumin putih telur
- f. Kompleks

### **3. Viskositas**

Pencampuran dengan aspirin dan *caffeine* menggunakan Shaking Water Bath Incubator (Yamato, BT 100, Japan), dengan kecepatan rendah, sampai homogen. Jumlah sampel yang dibutuhkan sehingga bisa dibaca viscometer (DV-E Viscometer, Brookfield, USA) adalah minimal 6 mL dalam setiap tabung. Sampel yang digunakan untuk pengukuran viskositas adalah :

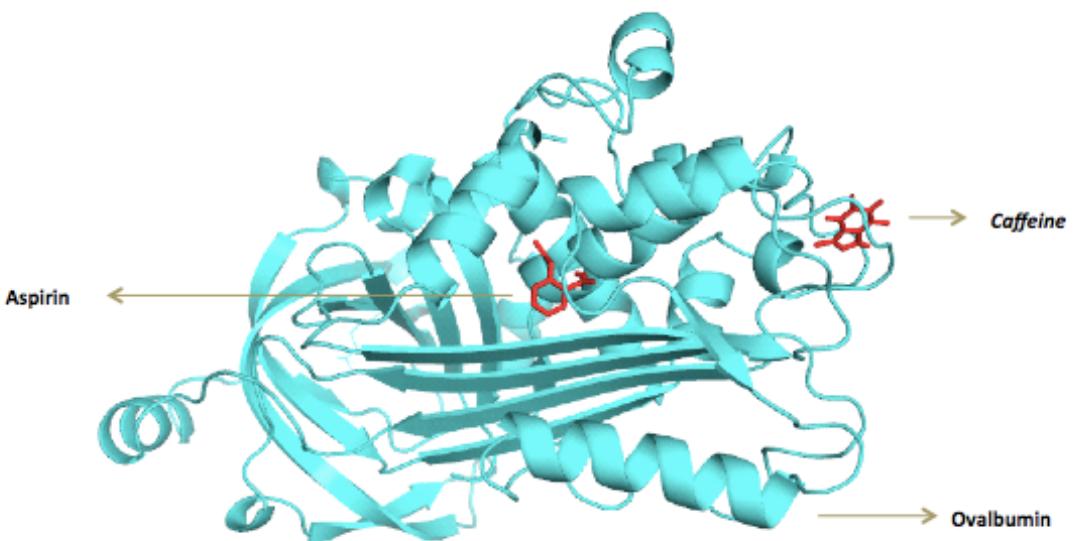
- a. Albumin putih telur
- b. Aspirin - albumin putih telur
- c. *Caffeine* - albumin telur
- d. Kompleks (aspirin - albumin putih telur - *caffeine*)

#### 4.1 Analisis Modeling Komputer (*In Silico*)

Energi ikatan yang dihasilkan dari *docking* aspirin, ovalbumin dan *caffeine* adalah 9 energi yaitu -5,5; -5,4; -5,3; -5,3; -5,1; -5,0; 4,8; -4,8; -4,7. Energi tersebut menunjukkan energi ikatan dengan 9 posisi pengikatan. Energi yang digunakan untuk pengikatan adalah energi terendah yaitu -5,5. Energi terendah membuat jarak terkecil antara aspirin dan *caffeine*, sedangkan energi terbesar membuat jarak yang jauh antara aspirin dan *caffeine*. Perubahan posisi aspirin dan *caffeine* kompleks pada ovalbumin menggunakan energi terkecil, karena memiliki energi paling kuat dan stabil untuk membentuk ikatan. Menurut Gotwals (2009), ketika bentuk molekul berubah, maka energi akan berubah, begitu juga ketika molekul dibengkokkan, diputar atau ditekan, maka energi juga akan berubah. Dalam kimia, stabilitas ditentukan oleh nilai energi terendah.

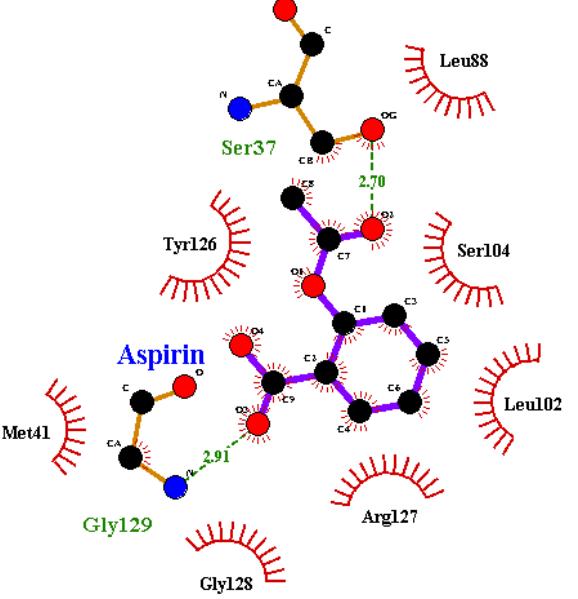
Hasil *docking* dari aspirin, ovalbumin dan *caffeine* adalah terjadinya kompleks dari ketiga bahan tersebut (Gambar 5). Pada ovalbumin tidak terdapat *binding site* yang spesifik dan tidak adanya kompetitif *docking* pada ovalbumin, ini dibuktikan bahwa aspirin dan *caffeine* menempati posisi yang berbeda, tidak saling berkompetisi.

Jadi kedua senyawa tersebut bisa saling bekerja sama.

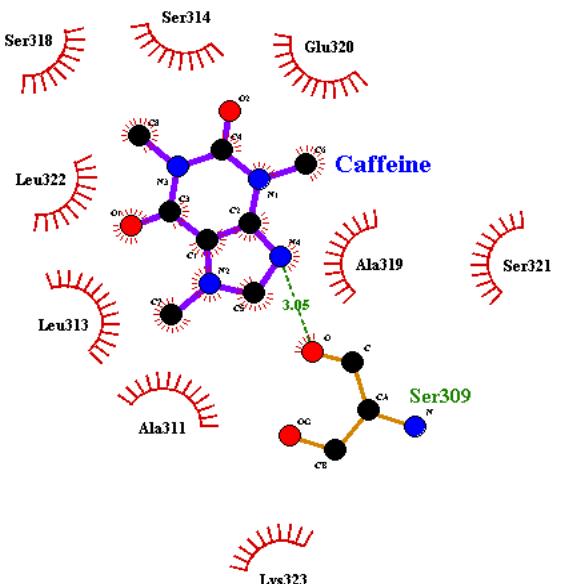


Gambar 5. Hasil docking aspirin-ovalbumin-*caffeine*

Setelah terjadinya kompleks melalui *docking*, aspirin dan *caffeine* berikatan dengan asam amino yang terdapat pada ovalbumin (Gambar 6 dan Tabel 3). Aspirin dan *caffeine* membentuk ikatan dengan protein hidrofobik dan hidrofilik pada ovalbumin.



(A)



(B)

Gambar 6. Ikatan asam amino ovalbumin terhadap aspirin (A) dan *caffeine* (B). Ikatan hidrogen ditunjukkan dengan sebuah garis hijau, dan ikatan hidrofobik ditunjukkan dengan garis kecil-kecil pada atom.

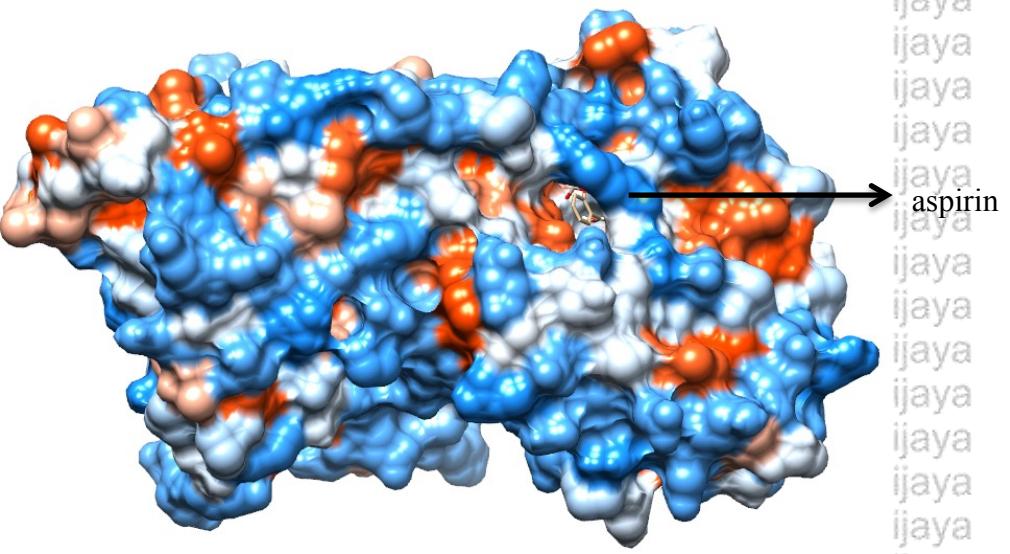
Protein yang teridentifikasi dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 3, dengan pengelompokan asam amino hidrofobik dan hidrofilik yang mengacu pada Lodish dkk (2004). Jenis ikatan yang terjadi pada kompleks aspirin-ovalbumin-*caffeine* adalah ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terlibat dalam fenomena kimia dan biologi penting (Zheng dkk, 2006), ketika dua molekul membentuk banyak ikatan hidrogen maka akan menjadi kuat dan stabil (Morozov & Kortemme, 2005). Ikatan-ikatan yang terbentuk menunjukkan keberhasilan *docking*, dan menunjukkan bahwa ovalbumin dapat membentuk kompleks dengan aspirin, *caffeine* sebagai pengangkut.

Tabel 3. Asam amino ovalbumin yang berinteraksi dengan aspirin dan *caffeine* setelah terjadi kompleks

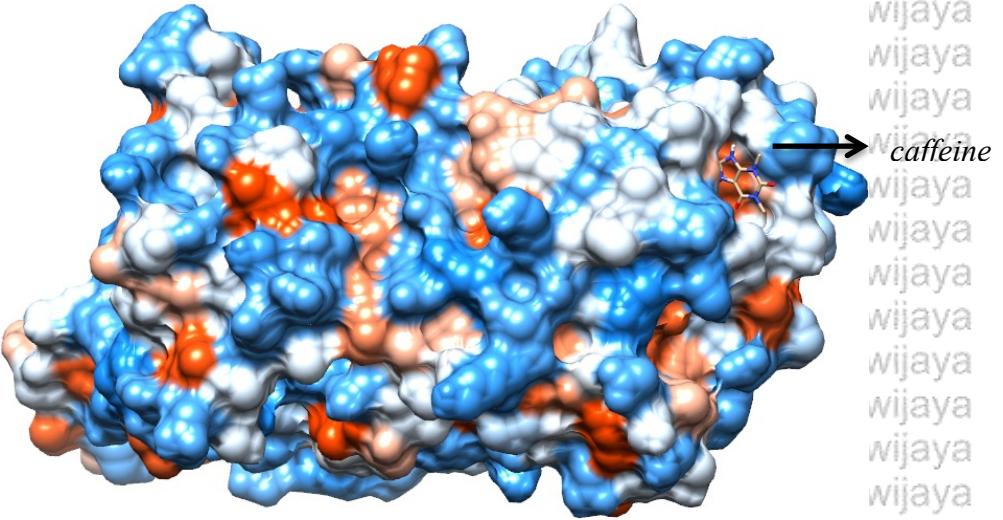
Senyawa	Asam Amino pada Ovalbumin	Sifat	Jenis Ikatan
Aspirin	Leusin 88 dan 102 Tirosin 126 Serin 104 Metionin 41 Glisin 128 Arginin 127 Serin 37 Glisin 129	Hidrofobik Hidrofobik Hidrofilik Hidrofobik Netral Hidrofilik Hidrofilik Netral	Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrogen
<i>Caffeine</i>	Leusin 313, 322 Serin 314,318,321 Asam Glutamik 320 Alanin 311, 319 Lisin 323 Serin 309	Hidrofobik Hidrofilik Hidrofobik Hidrofilik Hidrofobik	Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrofobik Hidrogen

Ovalbumin mempunyai asam amino hidrofilik dan hidrofilik, aspirin

mempunyai sifat yang sulit larut dalam air, sementara *caffeine* larut dalam air. Aspirin membentuk kompleks pada bagian tengah ovalbumin (*core*) (Gambar 7A), sedangkan *caffeine* membentuk kompleks pada bagian luar ovalbumin (Gambar 7B).



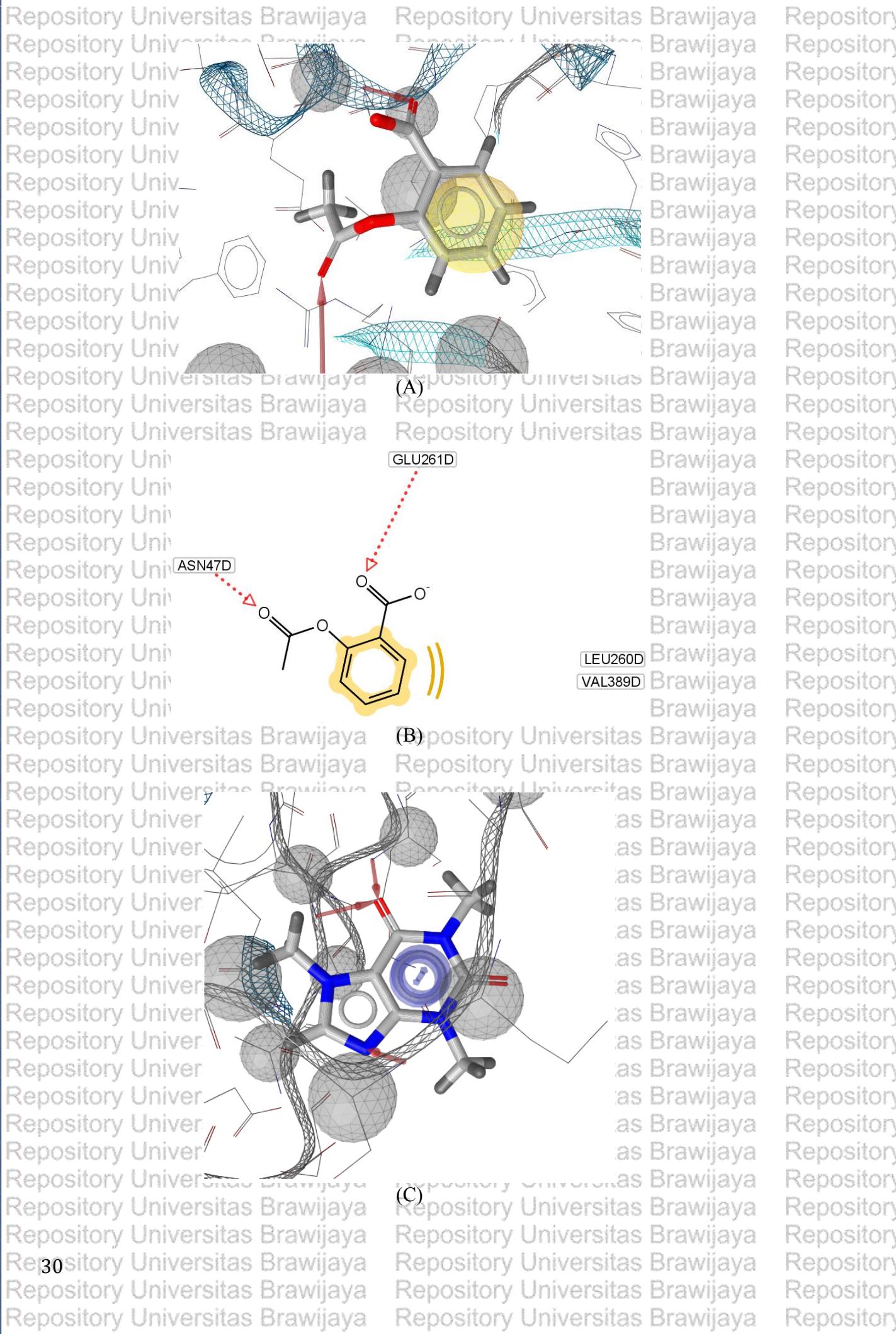
(A)

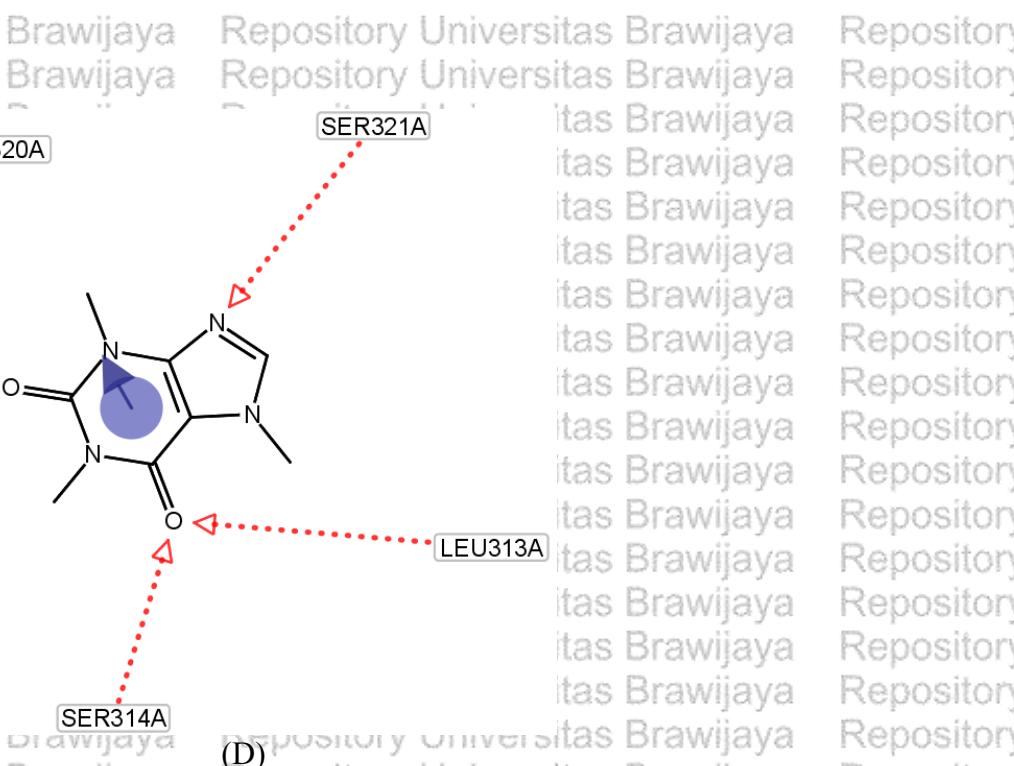


(B)

Gambar 7. Ovalbumin *Hydrophobicity*. Sisi ovalbumin yang membentuk kompleks dengan aspirin (A) dan caffeine (B), warna biru yang paling hidrofilik, ke warna putih, ke orange merah untuk yang paling hidrofobik.

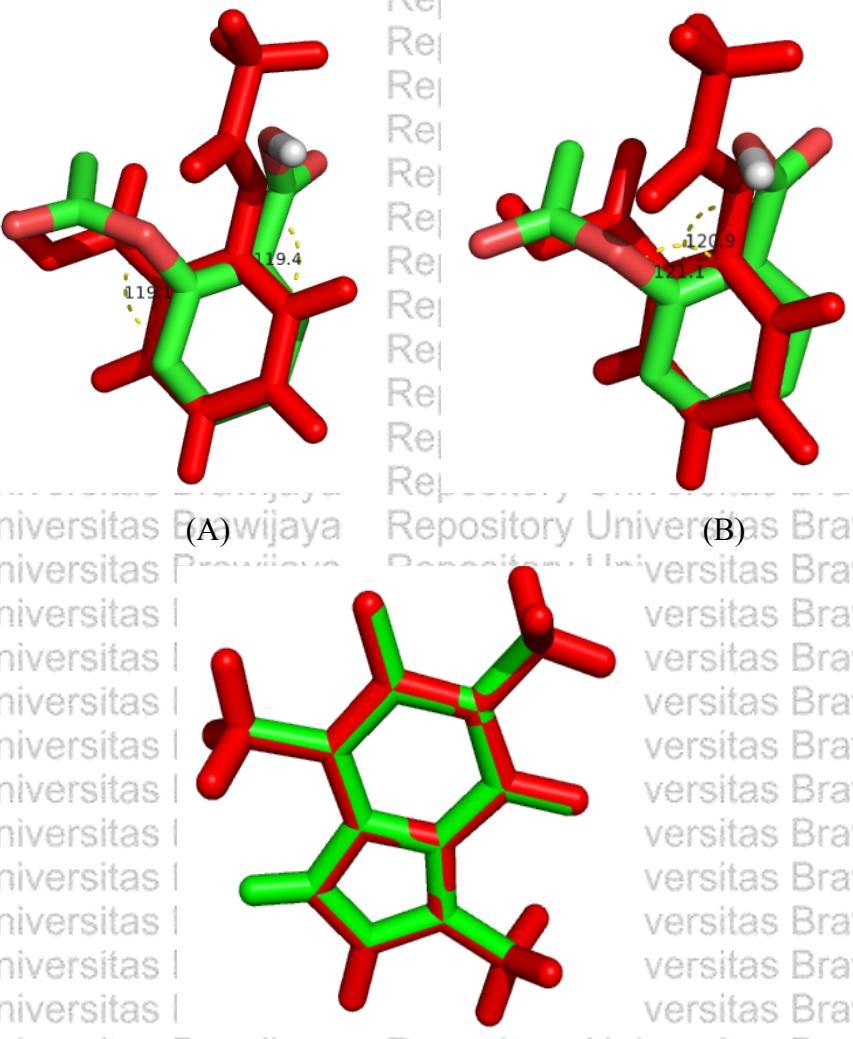
Interaksi aspirin terhadap ovalbumin menunjukkan adanya *hydrogen bond acceptor* (panah berwarna merah). Lingkaran berwarna kuning pada aspirin menunjukkan interaksi hidrofobik pada cincin aromatik. (Gambar 8A dan 8B). Lingkaran berwarna biru pada caffeine menunjukkan cincin aromatik, panah merah merupakan *hydrogen body acceptor* (Gambar 8C dan 8D).





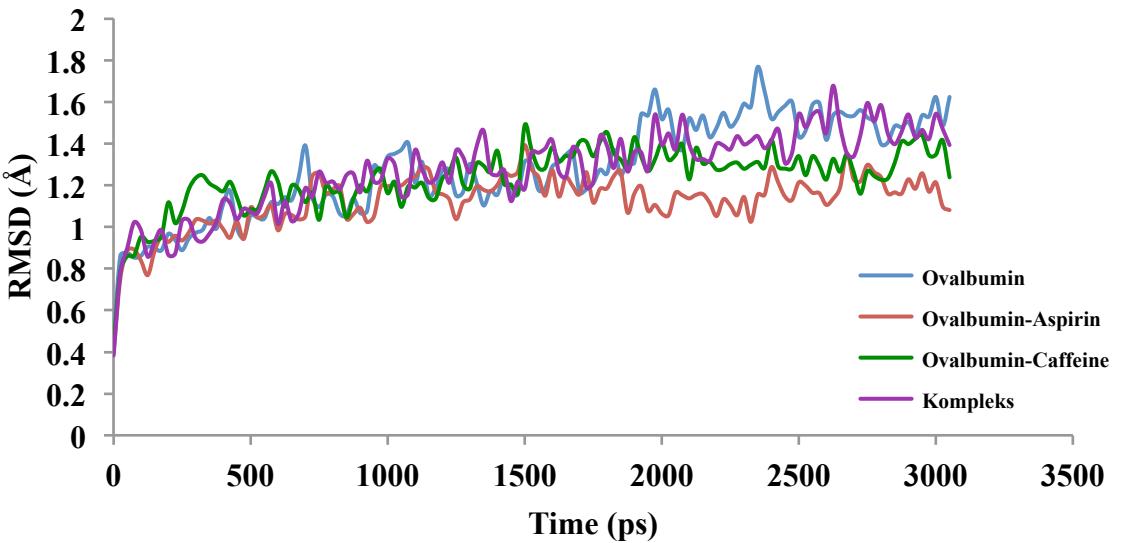
Gambar 8. Interaksi aspirin dan *caffeine* terhadap asam amino pada ovalbumin setelah terjadi kompleks. (A) Aspirin 3D, (B) Aspirin 2D, (C) *Caffeine* 3D, (D) *Caffeine* 2D.

Variabilitas struktur tridimensional aspirin ditunjukkan setelah berikatan dengan ovalbumin, aspirin berputar dan menghasilkan perubahan sudut ikatan. Perubahan sudut ikatan aspirin terjadi pada grup fungsional asam karboksilat, yaitu  $119,1^\circ$  sebelum *docking* dan  $119,4^\circ$  setelah *docking* (Gambar 9A). Perubahan sudut ikatan juga terjadi pada grup fungsional ester pada aspirin, yaitu  $120,9^\circ$  sebelum *docking* dan  $121,1^\circ$  setelah *docking* (Gambar 9B). Sedangkan pada *caffeine* tidak terjadi perubahan sudut ikatan (Gambar 9C). Senyawa alifatik cenderung menerima beberapa mekanisme pengikatan karena lebih fleksibel seperti rotasi, lipatan, dll. Sebaliknya, senyawa aromatik kurang fleksibel. Menurut Szycher (2013), fleksibilitas molekul tergantung pada kebebasan rotasi mengenai ikatan tunggal dalam rantai utama dari molekul polimer, pembatasan rotasi mengurangi fleksibilitas molekul. Rantai alifatik segeris cukup bebas untuk berputar. Ketika terdapat gugus aromatik, terutama dalam rantai utama, yang merupakan unit kaku, besar dan mengurangi fleksibilitas molekul. Ketika cincin aromatik terkonjugasi dengan gugus tak jenuh yang berdekatan dengan rantai utama, seluruh unit resonansi terkonjugasi menjadi jauh lebih besar, dan efek pengerasan jauh lebih besar.



Gambar 9. Struktur kimia aspirin (A, B) dan *caffeine* (C) ketika dibandingkan, sebelum (warna merah) dan sesudah (warna hijau) terjadi *docking* dengan ovalbumin.

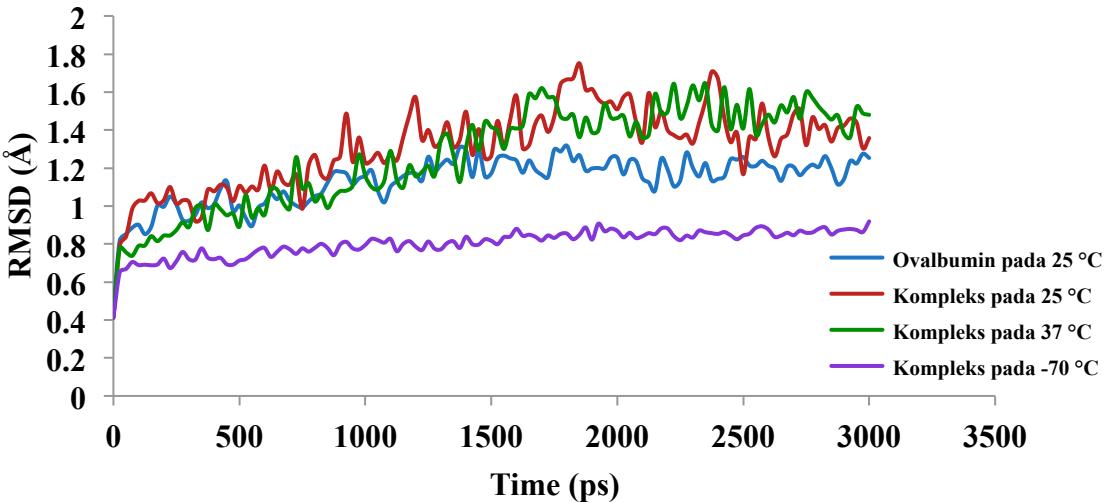
Ovalbumin (garis biru) sebagai kontrol, mempunyai pola RMSD yang terus meningkat dari 0,800 sampai 3050 ps (dari awal sampai akhir proses). Bila ovalbumin ditambah aspirin (garis merah, nilai RMSD ovalbumin adalah 1,129 Å) dan *caffeine* (garis hijau, nilai RMSD ovalbumin adalah 1,240 Å) mengalami penurunan pola, mulai dari 1900 sampai 3050 ps. Penambahan aspirin dan *caffeine* tersebut menunjukkan adanya perubahan struktur ovalbumin (Gambar 10). Pola RMSD pada penambahan aspirin dan *caffeine* menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut dapat mengubah konformasi dinamis ovalbumin. Dengan demikian, ovalbumin yang dikenal memiliki kapasitas untuk bertindak sebagai antioksidan peptide menunjukkan kerja



Gambar 10. The Root-Mean-Square-Deviation (RMSD) dari ovalbumin, aspirin, *caffeine* dan kompleks.

Pola RMSD pada kompleks (garis warna ungu, dengan nilai RMSD 1,279 Å) mempunyai kemiripan dengan ovalbumin sebagai kontrol positif (garis warna biru, dengan nilai RMSD 1,283 Å), garis meningkat, yaitu semakin banyak waktu semakin tinggi RMSD, dibandingkan dengan ovalbumin-aspirin warna merah maupun ovalbumin-*caffiene* warna hijau (Gambar 10). Pola RMSD kompleks tidak menunjukkan perubahan ikatan kimia yang signifikan terhadap struktur ovalbumin. Hasil tersebut menunjukkan sifat ovalbumin tidak berubah. Molekul ini sulit untuk diserap dalam sistem pencernaan karena enzim usus sulit mendegradasi ovalbumin (Oliveira dkk., 2007). Ovalbumin memiliki tingkat pencernaan proteolitik (bahkan oleh pepsin) yang jauh lebih lambat daripada tingkat hemoglobin sapi atau hidrolisis globin manusia (Walker & Taylor, 1978). Ini alasan mengapa ovalbumin tidak mempengaruhi farmakokinetik; ovalbumin juga bertindak sebagai *transporter* aspirin dan *caffiene*. Dari hal tersebut, kompleks ovalbumin dapat diterapkan sebagai *scavenger* antioksidan yang efektif.

Kompleks aspirin-ovalbumin-*caffiene* diberi perlakuan pada berbagai suhu (Gambar 11), yaitu 25 °C (suhu ruang), 37 °C (suhu tubuh), dan -70 °C (suhu *freeze-dry*). Pola RMSD dari kompleks dengan suhu 25 °C (garis merah, dengan nilai RMSD 1,318 Å) dan 37 °C (garis warna hijau, dengan nilai RMSD 1,272 Å) mempunyai



Gambar 11. *The Root-Mean-Square-Deviation* (RMSD) perlakuan suhu dari ovalbumin dan kompleks

Kompleks aspirin-ovalbumin-*caffeine* dengan perlakuan suhu -70 °C menunjukkan *intermolecular force*. Selama proses *freeze-dry*, kompleks telah kehilangan air menjadi padat. Kehilangan air mempengaruhi ikatan kimia, yang mana gerakan acak molekul dalam keadaan cair menjadi getaran di dalam molekul (*stretching* dan *bending*). Dengan demikian, *intermolecular forces* menjadi lebih kuat yang meningkatkan gaya magnet atau momen magnetik keseluruhan dalam sistem karena kecenderungan menurun ke arah *antiparallel coupling*. Dari penjelasan di atas, dapat disimpulkan bahwa medan magnet menjadi lebih kuat selama pembekuan kompleks. Menurut Chieh (2018), *intermolecular force* memainkan peran penting dalam menentukan sifat suatu zat, bagaimana molekul berinteraksi dan membentuk organisme biologis atau bahkan kehidupan.

Gerakan atom pada kompleks adalah stabil tetapi tidak fungsional, yang menghasilkan penguatan ikatan magnetik, sementara ikatan hidrofobik pada kompleks melemah. Semua atom mulai bergerak berdekatan dan kemudian membentuk pola

yang sangat teratur dengan molekul-molekul yang *rigid* dekat satu dengan yang lain menjadi kisi kristal. Dengan demikian, stabilitas struktur kompleks meningkat (tidak terdenaturasi) yang dapat mengubah fungsinya untuk menjadi *scavenger* yang kuat.

Menurut Muthunkumaran (2007), tidak adanya gerakan air dalam material selama *freeze-drying* dan produk yang kering memiliki sifat re-hidrasi yang sangat baik.

Air penting untuk protein karena perannya sebagai media untuk pergerakan molekul, sebagai lingkungan yang mendorong perubahan konformasi, dan sebagai reaktan untuk reaksi yang merugikan seperti hidrolisis. Oleh karena itu, banyak reaksi degradasi protein dapat ditekan atau dihilangkan seluruhnya dengan hanya menghilangkan air dengan *freeze-drying* (Chang dan Fischer, 1995).

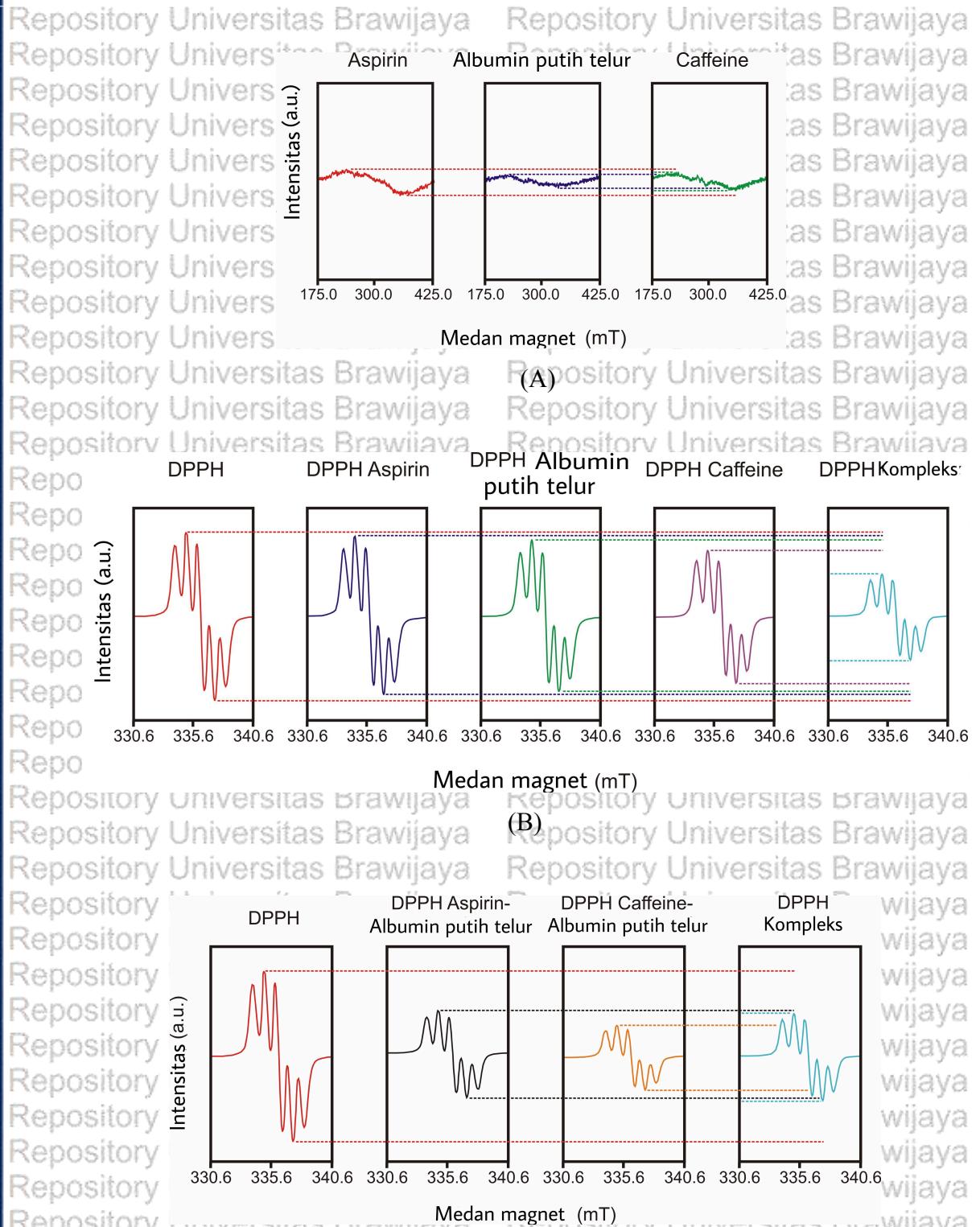
#### 4.2. Karakterisasi

##### 4.2.1 Analisis ESR

Beberapa metode digunakan untuk menentukan efek penangkal radikal dari molekul antioksidan. Metode yang banyak digunakan adalah metode DPPH karena kesederhanaannya tanpa alat khusus dan reaksi. Selain itu, metode ini memberikan pengukuran yang dapat dipercaya dan cepat. DPPH adalah radikal bebas sintetik, berwarna stabil yang tidak berubah pada air dan alkohol. Aktivitas radikal bebas dari molekul tergantung pada kemampuan mereka untuk melepaskan hidrogrn dan mengubah konformasi struktural komponen mereka (Shimada dkk., 1992; Soares dkk., 1997).

Soares dkk. (1997), melaporkan bahwa DPPH dengan mudah menerima hidrogen atau elektron dari molekul antioksidan untuk diubah menjadi molekul diamagnetik stabil. Pada laporan lain, Molyneux (2004), menyatakan bahwa DPPH kehilangan warna ungu ketika dicampur dengan zat donor hidrogen. Perubahan warna terjadi karena penurunan jumlah radikal DPPH dalam sistem. Oleh karena itu, perubahan warna dari DPPH berhubungan dengan aktivitas radikal dari molekul yang dianalisis. Dalam penelitian ini, aktivitas radikal *scavenging* dari aspirin, albumin putih telur, *caffeine*, aspirin-albumin putih telur, *caffeine*-albumin putih telur, dan kompleks dipelajari menggunakan ESR dengan DPPH sebagai radikal bebas.

Hasil ESR dari DPPH, aspirin, albumin putih telur, *caffeine* dan kompleks terdapat pada Gambar 12. Hasil ESR aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* adalah garis datar, yang menunjukkan bahwa ketiganya tidak mengandung radikal bebas.



Gambar 12. *Electron Spin Resonance* dari aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* (A)  
DPPH setelah ditambah aspirin, *caffeine*, albumin putih telur dan komplek  
(B), DPPH setelah ditambah dengan aspirin-albumin putih telur, *caffeine*-  
albumin putih telur (C).

DPPH sebagai radikal bebas mempunyai puncak tertinggi (Gambar 12B) dengan nilai g 2,0050. Bila DPPH ditambah aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* secara

terpisah sebagai senyawa tunggal akan mengalami sedikit penurunan puncak. Bila DPPH ditambah aspirin-albumin putih telur (Gambar 12C) menunjukkan penurunan puncak yang lebih banyak daripada penambahan aspirin secara tunggal. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pembentukan kompleks lebih dari satu senyawa lebih efektif daripada senyawa tunggal.

Penambahan *caffeine*-albumin putih telur pada DPPH menghasilkan puncak lebih rendah daripada penambahan senyawa kompleks (Gambar 12C). Puncak pada penambahan *caffeine*-albumin putih telur merupakan fenomena menarik, mekanisme ini masih belum jelas, dengan demikian memerlukan penyelidikan lebih lanjut. Semua hasil ESR mempunyai pola garis yang sama dengan DPPH (kecuali aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* secara tunggal), ini dikarenakan masih terdapat DPPH, walapun dengan penambahan *scavenger*.

Puncak DPPH menurun drastis ketika senyawa kompleks ditambahkan, daripada penambahan aspirin, albumin putih telur dan *caffeine* dalam bentuk tunggal (Gambar 12B). Penurunan puncak resonansi magnetik mencerminkan penurunan jumlah DPPH sebagai radikal bebas. Senyawa kompleks mempunyai banyak elektron permukaan yang dapat disumbangkan kepada DPPH melalui pergerakan elektron atau transisi. Kemudian, pasangan elektron yang dihasilkan menyebabkan penurunan intensitas DPPH sebagai radikal bebas. Selain itu, untuk menyumbangkan elektron, senyawa kompleks juga bisa menerima kelebihan elektron dari atom sehingga pembentukan radikal baru dapat dihindari.

Senyawa kompleks dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas yang komprehensif. Ketika aspirin atau *caffeine* digunakan sebagai antioksidan tunggal, memungkinkan menghasilkan radikal baru. Reaksi berantai radikal bebas dapat terputus oleh adanya antioksidan. Antioksidan menyumbangkan elektron pada radikal bebas, yang terbentuk selama oksidasi dari radikal itu sendiri, yang biasanya mengandung senyawa aromatik atau fenol (Brewer, 2011).

Ketika kombinasi aspirin-albumin putih telur atau *caffeine*-albumin putih telur ditambahkan, puncak radikal DPPH menurun lebih rendah daripada penambahan senyawa tunggal aspirin atau *caffeine*. Selain itu, penambahan *caffeine*-albumin putih telur pada DPPH menghasilkan intensitas puncak lebih rendah daripada penambahan senyawa kompleks (Gambar 12C). Puncak pada penambahan *caffeine*-albumin putih telur merupakan fenomena menarik, mekanisme ini masih belum jelas, dengan demikian memerlukan penyelidikan lebih lanjut.

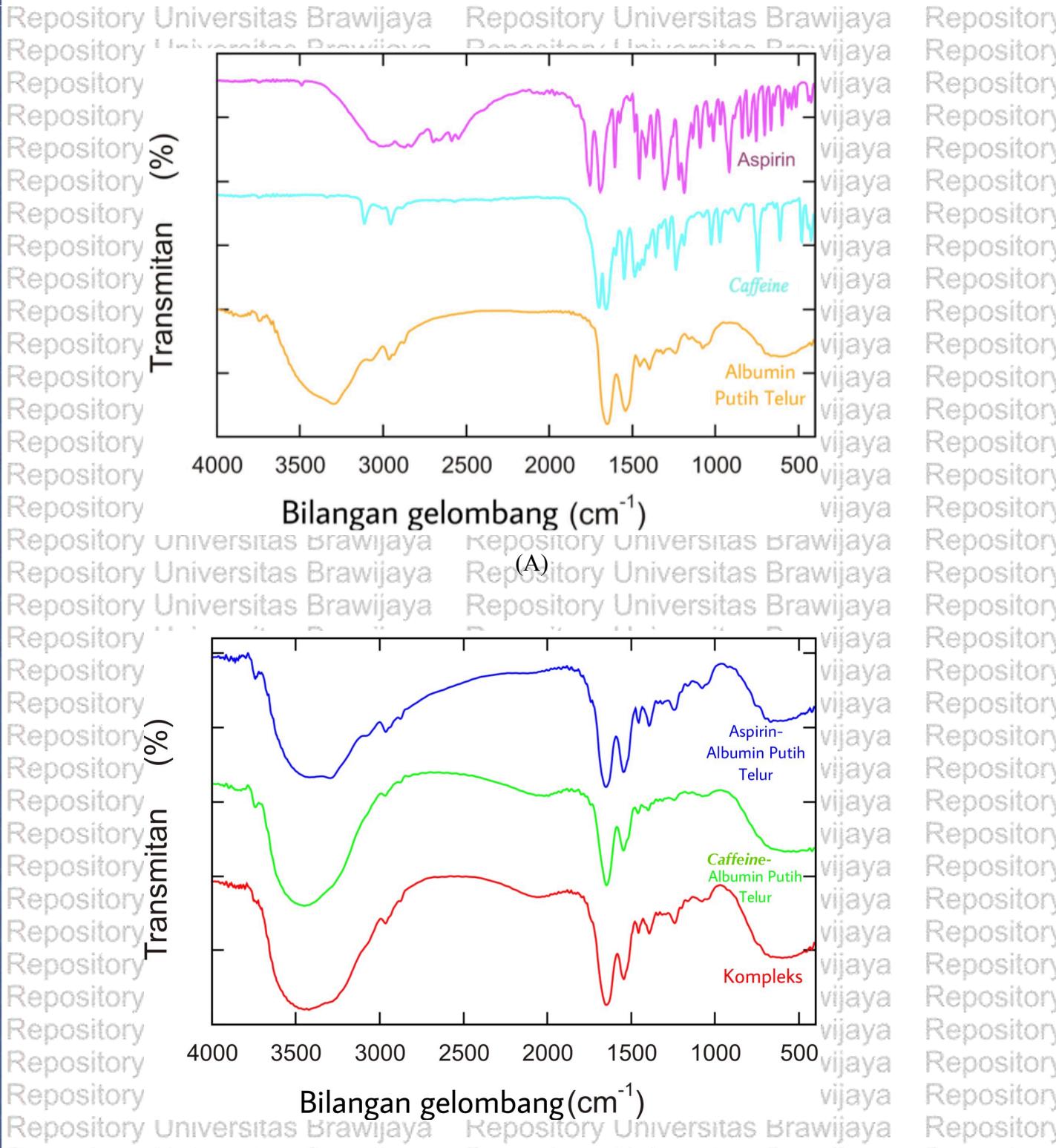
Repository Universitas Brawijaya  
Beberapa penelitian menggunakan antioksidan tunggal telah dilakukan menggunakan aspirin (Turnbull dkk., 2006), indomethacin (Turnbull dkk., 2006) dan astaxanthin (Polyakov dkk., 2013). Meskipun senyawa ini dapat menghambat pembentukan *spin-adduct*, namun dengan adanya konsentrasi yang relatif tinggi dari spesies oksigen reaktif, pembentukan spesies radikal baru tidak dapat dihindari.

Menurut Cryer dan Mahaffey (2014), aspirin awalnya sebagai obat untuk mengobati rasa sakit dan peradangan, serta obat yang biasa digunakan untuk mencegah penyakit kardiovaskuler. Tetapi efek samping gastrointestinal terkait dengan terapi aspirin terus menjadi komplikasi. Pada penelitian tersebut dengan pemberian aspirin dosis rendah harian (LDA), terjadi kerusakan mukosa gastrointestinal pada sekitar 40%-50% pasien.

Penelitian lain menyebutkan bahwa aspirin bentuk tunggal mempunyai efek yang berbeda dengan aspirin dalam bentuk kompleks. Penelitian aspirin pada hewan coba menyebabkan gastritis dan peningkatan Malondialdehid (MDA), namun aspirin dalam bentuk kompleks melindungi lambung dari gastritis dan menurunkan MDA (Widyarti dkk., 2018). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa penelitian dengan menggunakan antioksidan tunggal dapat menyebabkan efek yang berbeda, tetapi bila senyawa tunggal tersebut dalam bentuk kompleks akan menjadi *scavenger* yang mempunyai efek berkebalikan, yaitu dapat menyembuhkan penyakit.

#### 4.2.2 Analisis FTIR

Spektrum FTIR dari aspirin, albumin putih telur, *caffeine*, dan kompleks ditunjukkan pada gambar 13. Senyawa tunggal aspirin dan *caffeine* (Gambar 13A) mempunyai pola garis yang sama, yaitu mempunyai banyak puncak. Setelah senyawa tunggal dikomplekskan dengan albumin putih telur (Gambar 13B), maka pola garis menyesuaikan dengan pola albumin putih telur, begitu juga dengan kompleks aspirin-albumin putih telur-*caffeine*.



Gambar 13. Spektrum FTIR. (A) Aspirin, *caffeine* dan albumin putih telur. (B) Aspirin kombinasi dengan albumin putih telur, *caffeine* kombinasi dengan albumin putih telur, dan kompleks.

Gugus fungsi dari masing-masing senyawa tunggal dan kompleks terdeteksi pada puncak tajam. Tetapi gugus aromatik aspirin dan *caffeine* terdeteksi pada bilangan gelombang tidak pada puncak tajam (Tabel 4).

Tabel 4. Gugus fungsi dari senyawa tunggal dan kompleks

Sampel	Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Ikatan	Gugus Fungsi
Aspirin	1693,38	C=O	Asam karboksilat, <i>stretching</i>
	1188,38	C-H	Alkil halida, <i>waging</i>
	916,12	O-H	Asam karboksilat, <i>bending</i>
	1575,73	C-C=C	Cincin aromatik, <i>symmetric stretch</i>
<i>Caffeine</i>	1656,74	C=C	Alkena, <i>stretching</i>
	742,54	C-H	Alkena
	1598,88	C-C=C	Cincin aromatik, <i>symmetric stretch</i>
Albumin putih	3296,12	O-H	Asam karboksilat, <i>stretching</i>
telur	1650,95	C=C	Alkena, <i>stretching</i>
	1541,02	C-C	Cincin aromatik
Aspirin-Albumin	3296,12	O-H	Keton, <i>stretching</i>
putih telur	1649,02	C=O	Keton, <i>stretching</i>
	698,18	C-H	Aromatik, <i>bending</i>
<i>Caffeine</i> -Albumin	3448,49	O-H	<i>Stretching</i>
putih telur	1647,10	C=O	Keton, <i>stretching</i>
	1544,88	C=C	Aromatik
Kompleks	3450,41	O-H	<i>Stretching</i>
	1649,02	C=O	Amida, <i>stretching</i>
	1542,95	C=C	Aromatik
	665,40	N-H	1,2 Amina, <i>waging</i>

Setelah terjadi kompleks aspirin-albumin putih telur menghasilkan reaksi kimia

yang menghasilkan gugus C=O pada  $1649,02 \text{ cm}^{-1}$ . Di sisi lain, *caffeine*-albumin putih telur yang merupakan kelompok amino bereaksi pada kelompok C=O dengan *caffeine* pada kelompok C-O, yang terdeteksi pada  $1074,28 \text{ cm}^{-1}$ . Hasil analisis FTIR menunjukkan interaksi kimia antara kompleks aspirin-albumin putih telur-*caffeine*,

Repository Universitas Brawijaya  
yang ditunjukkan dengan *stretching* ikatan C=O pada  $1649,02\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan amida.  
Ciri penting dari gugus karbonil (C=O) memiliki atom karbon dengan karakter positif dan atom oksigen dengan karakter negatif (Siue, 2018). Karena perbedaan dalam afinitas elektron atom karbon dan oksigen, pasangan elektron yang membentuk ikatan rangkap lebih dekat ke atom oksigen daripada atom karbon; atom oksigen yang kaya elektron memperoleh muatan negatif dan atom karbon yang kekurangan elektron bermuatan positif. Dengan demikian, molekul yang mengandung gugus karbonil bersifat polar. Kelompok karbonil dapat masuk ke dalam berbagai reaksi kimia; reagen nukleofilik (reagen kaya elektron) tertarik pada atom karbon, sedangkan reagen elektrofilik (reagen yang mencari elektron) tertarik pada atom oksigen (Encyclopaedia Britannica, 2018). Ikatan amida banyak ditemukan pada senyawa alami dan sintetik, yang penting dalam farmasi (Lanigan dkk., 2013).

Semua analisis FTIR dalam penelitian ini menunjukkan adanya kelompok aromatik, yang berguna sebagai molekul *scavenger*. Senyawa aromatik lebih stabil dan geometrianya cenderung lebih teratur (Schleyer, 2001). Gugus hidroksil yang terdapat dalam struktur aromatik Tyr dapat membuatnya beraksi, seperti halnya kasus pada senyawa fenolik lainnya, sebagai antioksidan pemecah rantai mengikuti mekanisme transfer atom hidrogen (Davalos dkk., 2004).

#### 4.2.3 Viskositas

Viskositas sampel yang telah terukur terdapat pada Tabel 5, dengan satuan centipoise (cP).

Tabel 5. Viskositas

Sampel	Viskositas (centipoise)
Albumin putih telur (kontrol)	$7,95 \pm \text{SD } 0,30$
Caffeine - albumin putih telur	$7,73 \pm \text{SD } 0,36$
Kompleks	$6,87 \pm \text{SD } 0,33$
Aspirin - albumin putih telur	$5,53 \pm \text{SD } 0,26$

Albumin putih telur mempunyai nilai viskositas yang paling tinggi (7,95 cP), menurun (5,53 cP) bila ditambahkan aspirin dan mempunyai nilai yang paling rendah diantara sampel lain. Aspirin menyebabkan fenomena pengenceran, yang ditunjukkan dengan penurunan viskositas. Fenomena ini mirip dengan serum darah manusia yang

menjadi encer ketika berinteraksi dengan aspirin. Aspirin yang telah membentuk kompleks akan mengalami perubahan bentuk sudut ikatan seperti pada penelitian *in silico*. Posisi aspirin saat membentuk kompleks berada pada posisi *core* yaitu lebih masuk ke dalam albumin putih telur, yang cenderung berikatan dengan asam amino hidrofobik. Ikatan yang terjadi antara aspirin dan albumin putih telur dapat mengubah posisi dari gel menjadi sol. Distribusi energi Gibb berubah seiring dengan dinamika konformasi kompleks albumin-aspirin (Alvarez dkk., 2012).

Perlu dikaji lebih lanjut mengapa *caffeine* tidak mengubah viskositas albumin. Terdapat kemungkinan asam amino hidrofilik pada albumin putih telur yang terdesak ke permukaan ketika albumin mengikat aspirin, sementara ikatan dengan *caffeine*, tidak mengubah posisi asam amino dari gel menjadi sol. Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil *in silico* bahwa *caffeine* tidak berubah sudut ikatannya setelah terjadi kompleks.

Nilai viskositas kompleks berada di antara nilai albumin putih telur dengan penambahan aspirin dan albumin putih telur dengan penambahan *caffeine*, yaitu 6,87 cP yang hampir mirip dengan viskositas duodenum *mucin* pada perut (Georgiades dkk., 2014). Hal tersebut menunjukkan bahwa kompleks mempunyai viskositas yang tepat untuk agen terapeutik ketika diterapkan untuk antioksidan *scavenger* dalam sistem saluran pencernaan. Kompleks memiliki viskositas yang sama dengan fisiologi lambung normal, dengan nilai yang sama dengan mukus duodenal manusia normal, yaitu 6,1 cP (Curt & Pringle, 1969). Mukus mampu bertindak sebagai antioksidan dan mengurangi kerusakan mukosa oleh mediasi radikal bebas oksigen (Repetto & Llesuy, 2002).

Viskositas merupakan friksi atau gesekan antar molekul. Nilai viskositas kompleks menunjukkan perubahan bentuk albumin putih telur yang mempengaruhi distribusi elektron di permukaan molekul. Pada tingkat molekuler, viskositas adalah hasil interaksi antara molekul yang berbeda. Seperti dalam kasus gesekan antara padatan bergerak, viskositas akan menentukan energi yang diperlukan untuk membuat aliran fluida (Rheo Sense, 2018).

#### **4.3. Keterkaitan penelitian**

Hasil dari penelitian *in silico* menunjukkan keterkaitan dengan hasil laboratorium. Keberhasilan *docking* ditunjukkan dengan adanya ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen diantara asam amino ovalbumin dengan aspirin dan *caffeine*, hal

tersebut menunjukkan bahwa ovalbumin dapat mengikat ligan atau membawa senyawa lain. Selain hasil *docking*, pola garis RMSD kompleks (Gambar 10) yang mirip dengan ovalbumin sebagai kontrol. Hal tersebut menunjukkan perubahan struktur ovalbumin yang tidak signifikan yang mengarah ke transporter, karena ovalbumin hanya sebagai pengangkut dan sulit tercerna.

Secara *in silico*, struktur aspirin mengalami perubahan sudut setelah *docking* sedangkan *caffeine* tidak mengalami perubahan (Gambar 9). Perubahan bentuk struktur aspirin dalam kompleks mempengaruhi struktur ovalbumin, hal ini menunjukkan hasil yang sama pada viskositas. Albumin putih telur akan mengalami penurunan nilai viskositas bila ditambah aspirin, sedangkan pada penambahan *caffeine* nilai viskositas mengalami sedikit penurunan.

RMSD kompleks dengan perlakuan suhu -70 °C (Gambar 11) mempunyai karakter atom yang stabil dan meningkatkan kekuatan magnetik. Hasil tersebut berkaitan dengan ESR yaitu kompleks (Gambar 12B) yang mampu mereduksi DPPH sebagai radikal bebas yang merupakan *scavenger* efektif.

Dari hasil *in silico*, setelah membentuk kompleks, aspirin berada di bagian dalam ovalbumin, yaitu berikatan dengan asam amino yang bersifat hidrofobik. Selain itu, aspirin dan *caffeine* mempunyai ukuran molekul yang kecil dan albumin putih telur merupakan protein yang besar. Fenomena tersebut berkaitan dengan pola FTIR, yaitu setelah aspirin dan *caffeine* berikatan untuk membentuk kompleks dengan albumin maka pola tersebut mengikuti pola albumin putih telur. Tetapi aspirin dapat mengubah sifat albumin putih telur. Ini berkaitan dengan viskositas albumin yang berubah bila ditambah aspirin.

Jadi senyawa kompleks merupakan antioksidan yang membentuk kompleks dengan albumin putih telur, yang mempunyai kekuatan mereduksi radikal bebas tanpa ikut tercerna. Viskositas dari kompleks menunjukkan sifat yang sama dengan *mucin usus* sebagai penghalang patogen.

43



## **5.2 Saran**

Saran dari penelitian ini adalah :

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kompleks albumin putih telur-*caffeine* dengan hidroksil superoksid *scavenging*, dan anion superoksid *scavenging*, hydrogen peroxide, serta hydroxyl.

## **BAB V** **KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Dalam penelitian ini, secara *in silico* setelah menjadi kompleks terjadi perubahan sudut ikatan fungsional ester pada aspirin, tetapi tidak terlihat pada *caffeine*. Pola garis RMSD kompleks hampir sama dengan ovalbumin dan tidak menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap struktur ovalbumin. Hasil tersebut menunjukkan sifat ovalbumin tidak berubah. Ini alasan mengapa ovalbumin tidak mempengaruhi farmakokinetik; ovalbumin juga bertindak sebagai *transporter* aspirin dan *caffeine*. Kompleks aspirin-ovalbumin-*caffeine* dengan perlakuan suhu -70 °C menunjukkan *intermolecular force*. Gerakan atom pada kompleks adalah stabil tetapi tidak fungsional, yang menghasilkan penguatan ikatan magnetik, sementara ikatan hidrofobik pada kompleks melemah. Semua atom mulai bergerak berdekatan dan kemudian, membentuk pola yang sangat teratur dengan molekul-molekul yang *rigid* dekat satu dengan yang lain menjadi suatu kisi kristal. Dengan demikian, stabilitas struktur kompleks meningkat (tidak terdenaturasi) yang dapat mengubah fungsinya untuk menjadi *scavenger* yang kuat. Dan ditunjukkan dengan hasil ESR kompleks yang dapat mereduksi DPPH sebagai radikal. Semua analisis FTIR dalam penelitian ini menunjukkan adanya kelompok aromatik, yang berguna sebagai molekul *scavenger*. Nilai viskositas kompleks berada di antara nilai albumin-aspirin dan albumin-*caffeine*, yaitu 6,87 cP yang hampir mirip dengan viskositas duodenum *mucin usus*.

- DAFTAR PUSTAKA**
- Agyemang-Yeboah, F. & S. Y. Oppong. 2013. Caffeine: The Wonder Compound, chemistry and Properties Topical Series in Health Science 1 (TSHS-1) 27–37.
- Algra, A. M. & P. M. Rothwell. 2012. Effects of Regular Aspirin on Long-Term Cancer Incidence and Metastase: A Systematic Comparison of Evidence from Observational Studies Versus Randomized Trials. *The Lancet Oncology* 13(5): 518–27.
- Alvarez, H.A., A.N. Mc Carthy & J.R. Grigera. 2012. A Molecular Dynamics Approach to Ligand - Receptor Interaction in the Aspirin-Human Serum Albumin Complex. *J Biophys.*
- Brewer, M.S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 10.
- Chang, B.S. & N.L. Fischer. 1995. Development of an Efficient Single-Step Freeze-Drying Cycle for Protein Formulations. *Pharm.Res.* 12 (6).
- Chieh. 2018. Intermolecular Forces. <http://www.science.uwaterloo.ca/~cchieh/cact/c123/intermol.html>. Diakses 02 Agustus 2018.
- Choe, E. & D.B. Min. 2009. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Compr.rev.Food Sci.Food Saf.* 8
- Choi, M. J., S. Briancon, J. Andriea, S. G. Min & H. Fessi. 2010. Effect of Freeze-Drying Process Condition on the Stability of Nanoparticles. *Drying Technol* 22(1&2): 335-346.
- Cryer, B. and K.W.Mahaffey. 2014. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnostis, and treatment. *J.Multidiscip.Healthc.* 7: 136-146.
- Curt, J.R.N. & R. Pringle. 1969. Viscosity of Gastric Mucus in Duodenal Ulceration. *Gut* 10: 931-34.
- Davalos, A., M.Miguel, B.Bartolome & R.Opez-Fandino. 2004. Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzimatic Hydrolysis. *J.Food Prot.* 67(9): 1939-1944.
- Davies, M.J. 2016. Review Article Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.* 473: 805-825.
- Ekins, S., J. Mestres & B. Testa. 2007. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br. J. Pharmacol.* 152: 9-20.
- Encyclopaedia Britannica. 2018. Viscosity. <https://www.britannica.com/science/viscosity>. Diakses 15 Mei 2018.
- Encyclopaedia Britannica. 2018. Carbonyl group. <https://www.britannica.com/science/carbonyl-group>. Diakses 2 Juli 2018.
- Fishberg, E.H. 1930. The Significance of Changes of Viscosity in Pathological Sera. *J.Biol.Chem* 85: 465-475.
- Georgiades, P., P.D. Pudney, D.J. Thornton, T.A. Waigh. 2014. Particle Tracking Microrheology of Purified Gastrointestinal Mucins. *Biopolymers* 101: 366-77.
- Giapo. 2013. The Chemistry of Egg Whites. <http://giapo.com/2013/04/the-chemistry-of-egg-whites/>. Diakses 30 April 2013.
- Gomes, I. 1998. Aspirin: A neuroprotective agent at high doses? *Review Article. The National Medical Journal of India* 11(1).
- Gotwals, B. 2009 Determining the Ideal Conformer for Drug Molecules. NCSSM Online, Spring. Diakses tanggal 18 Juni 2013.
- Gruebele, M. & D. Thirumalai. 2013. Perspective: Reaches of Chemical Physics in Biology. *The Journal of Chemical Physics* 139: 12701.

- Guerrero A., J.A. Gonzalez-Correa, M.M. Arrebola, J. Munoz-Marin, F.S. De La Cuesta, & J.P. De La Cruz. 2004. Antioxidant effects of a single dose of acetylsalicylic acid and salicylic acid in rat brain slices subjected to oxygen-glucose deprivation in relation with it's antiplatelet effect. *J Neulet.* 358:153-56
- Guo, F., S.C. Li, W. Ma & L. Wang. 2013. Detecting Protein Conformational Changes in Interactions via Scaling Known Structures. *J of Computational Biology* 20.
- Halliwell, B. & Sacramento. 1991. Reactive Oxygen species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *Am.J.Med.* 91.
- Honzel, D., S.G. Carter, K.A. Redman, A.G.Schauss, J.R.Endres, & G.S.Jensen. 2008. Comparison of Chemical and Cell-Based Antioxidant Methods for Evaluation of Foods and Natural Products: Generating Multifaceted Data by Parallel Testing using Erythrocytes and Polymorphonuclear Cells. *J. Agric. Food Chem.* 56: 8319-8325.
- International Food Information Council Foundation. 2013. Fact Sheet: Caffeine and Performance. <http://www.ruvie.com/Articles/Facts—Caffeine-and-Performance%203-18-08.pdf>. Diakses tanggal 27 Januari 2014.
- Intertek Laboratory. 2014. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Analysis. <http://www.intertek.com/analysis/ftir/>. Diakses tanggal 27 januari 2014.
- Jones, T. 2003. Molecular Medicine: A Study of the Molecular Structure, Properties, and Reactivity of Common Pain relief Remedies. <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=14&cad=rja&sqi=2&ved=0CHgQFjAN&url=http%3A%2F%2Fcoedpages.uncc.edu%2Fcstem%2FDocument%2520Hold-OLD%2FMolecular%2520Medicine%2520-%2520Travis.doc&ei=qOe-Ubr4I8rJrAe4goHABQ&usg=AFQjCNErq4VU32rbjx86-qeGx-Vo-6U7g&bvm=bv.47883778,d.bmk>. Diakses 1 September 2014.
- Kasimala, B. B. & M. B. Kasimala. 2011. Caffeine in Chocolates a Hazardous Sign to Children's Health. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2(6): 1757-1760.
- Kovacs-Nolan, J., M. phillips & Y. Mine. 2005. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *J. Agric. Food Chem* 53: 8421-8431.
- Krieger, E., T. Darden, S.B. Nabuurs, A. Finkestein, & G. Vriend. 2004. Making Optimal of Empirical Energy Functions: Force-Field Parameterization in Crystal Space. *Proteins* 57: 678-83.
- Krumholz, H. M., M. J. Radford, E. F. Ellerbenck, J. Hennen, T. P. Meehan, M. Petrillo, Y. Wang, T. F. Kresowik, & S. F. Jencks. 1995. Aspirin in the Treatment of Acute Myocardial Interaction in Ederly Medicare Beneficiaries: Patterns of Use and Outcomes. *Circulation* 92 (10): 2841–2847.
- Laboratorium Mikrobiologi. 2013. Hasil Analisis Uji Mikrobiologi. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
- Lanigan, R.M., P. Starkov, & T.D.Sheppard. 2013. Direct Synthesis of Amida from Carboxylic Acids and Amines Using B(OCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. *J.Org.Chem.* 78: 4512-4523.
- Lamina, S., C.I. Ezema, A.I.Theresa, & E.U.Anthonia. 2013. Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxid Antioxid Med Sci.* 2(2): 83-91.
- Leblanc, G.E., R.A.Secco, & M.Kostic. 2000. Viscosity Measurement. CRC Press LLC.
- Lee, C. 2000. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin. Chim. Acta* 295: 141-154.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, & N.Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky,

- Repository Universitas Brawijaya & J. Darnell. 2004. **Molecular Cell Biology**. Fifth Edition. W. H. Freeman and Company. New York.
- Repository Universitas Brawijaya Makarova, K. 2011. **New Approach To Analyse Spin Probe and Spin Trap ESR**. PhD thesis, Wageningen University, Nederland. ISBN: 978-90-8585-840-9.
- Repository Universitas Brawijaya MacDonald, S. 2002. Aspirin use to be banned in under 16 years olds. *BMJ* 325(7371): 988.
- Repository Universitas Brawijaya McDonald, A. 2011. Precare, Caffeine, Aspirin and more (a literature review). [www.firstendurance.com](http://www.firstendurance.com). Diakses 27 Januari 2014.
- Repository Universitas Brawijaya Messier, P. 1991. Protein Chemistry of Albumen Photographs. [http://albumen.conversation-us.org/library/c20/messier1991a.html](http://albumen.conervation-us.org/library/c20/messier1991a.html). Diakses tanggal 25 Januari 2014.
- Repository Universitas Brawijaya Murtaza, G., S. Karim, M. Majam-Ul-Haq, M. Ahmad, T. Ismail, S.A. Khan, M.H.H.Bin Asad & I. Hussain. 2014. Interaction Analysis of Aspirin with Selective Amino Acids. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug research* 71(1): 139-143.
- Repository Universitas Brawijaya Molyneux P. 2004. The Use of The Stable Free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26: 211-19.
- Repository Universitas Brawijaya Moretti, S. 2011. *In Silico* Experiments in Scientific Papers on Molecular Biology. *Sci. Stud.* 24(2): 23-42.
- Repository Universitas Brawijaya Morozov A.V., & T. Kortemme 2005. Potential Functions for Hydrogen Bonds in ProteinStructure Prediction and Design. *Adv.Protein Chem.* 72: 1-38.
- Repository Universitas Brawijaya Muthunkumaran, A. 2007. **Foam-Mat freeze Drying of Egg White and Mathematical Modeling**. Department of Bioresource Engineering, Macdonald Campus of McGill University. Thesis.
- Repository Universitas Brawijaya Nafisi, S., G.B. Sadeghi, & A. PanahYab. 2011. Interaction of aspirin and vitamin C with bovine serum albumin. *J. Photochem. and Photobiol., B* 105: 198-202.
- Repository Universitas Brawijaya NCBI. 2015. Ovalbumin. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Diakses 1 Januari 2015.
- Repository Universitas Brawijaya Nimalaratne, C. & J.Wu. 2015. Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review. *Nutrients* 7: 8274-8293.
- Repository Universitas Brawijaya Nimse, S.B. & D. Pal. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanism. *RSC. Adv* 5: 27986-28006.
- Repository Universitas Brawijaya Nireesha, G.R., L. Divya, C. Sowmya, N. Venkateshan, M. N. Babu & V. Lavakumar. 2013. Lyophilization/ Freeze Drying-An Review. *Int. J. Novel Trends Pharm. Sci.* 3(4): 2277-2782.
- Repository Universitas Brawijaya Oliveira, F.M., E.M. Dos Santos, A.C. Alves, M.A. Campana-Pereira, G.A. Ramaldes, V.N. Cardoso, V. Ruiz-de-Souza, & CM Gontijo. 2007. Digestion, Absorption and Tissue Distribution of Ovalbumin and Palmitoyl-Ovalbumin: Impact on Immune Responses Triggered by Orally Administered Antigens. *Scand. J. Immunol.* 65: 139-147.
- Repository Universitas Brawijaya Pala, F.S. & K.Tabakcioglu. 2007. Free radicals: Our enemies or friends? *Advances in Molecular Biology* 1: 63-69.
- Repository Universitas Brawijaya Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, & T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput Chem* 13: 1605-12.
- Repository Universitas Brawijaya Pham-Huy, L. A., H. He. & C. Pham-Huy. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. of Biomed. Sci.* 4(2): 89-96.
- Repository Universitas Brawijaya Polyakov, N.E., A. Magyar & L.D. Kispert. 2013. Photochemical and Optical Properties of water-Soluble Xanthophyll Antioxidants: Aggregation vs Complexation. *J. Phys. Chem. B* 117: 10173-82.
- Repository Universitas Brawijaya Pubchem. 2015. Aspirin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Diakses 1 Januari 2015.
- Repository Universitas Brawijaya Pubchem. 2015. Caffeine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Diakses 1 Januari 2015.

- Pymol. 2010. The PyMol Molecular Graphics System. Version 1.3 Scrodinger, LLC
- Repetto, M.G. & S.F. Llesuy. 2002. Antioxidant Properties of Natural Compounds Used in Popular Medicine for Gastric Ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 523-34.
- RheoSense. What is Viscosity. <http://www.rheosense.com/what-is-viscosity>. Diakses 2 Juli 2018.
- Rismawati, V. 2018. Pengaruh Pemberian Kompleks Scavenger AOC (*Aspirin-Ovalbumin-Caffeine*) terhadap Perbaikan Mukosa Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Gastritis. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya.
- Rothwell, P. M., J. F. Price, F. G. R. fowkers, A. Zanchetti, M. C. Roncaglioni, G. Tognoni, R. Lee, J. FF. Belch, M. Wilson, Z. Mehta & T. W. Meade. 2012. Short-term Effects of Daily Aspirin on Cancer Incidence, Mortality, and Non-vascular death: Analysis of the Time Course of Risks and benefits in 51 Randomised controlled trials. *The Lancet* 379(9826): 1602- 1612.
- Rothwell, P. M., M. Wilson, J. F. Price, J. FF. Belch, T. W. Meade, & Z. Mehta. 2012. Effect of Daily Aspirin on risk of Cancer Metastasis: a Study of Incident Cancers During Randomised Controlled Trials. *The Lancet* 379(9826): 1591.
- Rukmini, M.S., B. D'Souza, & V. D'Souza. 2004. Superoxide Dismutase and Catalase Activities and Their Correlation with Malondialdehyde in Schizophrenic Patients. *Indian J.Clin.Biochem.* 19(2): 114-118.
- Sandi, Q.A. 2018. Pengaruh Kompleks Scavenger AOC (*Aspirin-Ovalbumin-Caffeine*) terhadap Distribusi Malondialdehid (MDA) pada Jaringan Mukosa Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Gastritis Induksi Aspirin. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya.
- Sawynok, J. 2010. Caffeine and Pain. *International Association for the Study of Pain*, 152 (2011): 726-729.
- Schleyer, P.R. 2001. Introduction: Aromaticity. *Biochem.Rev.* 101
- Scaiano, J. C. 2013. Control of Chemical Reactions with Magnetic Fields. <http://www.uottawa.ca/publications/interscientia/inter.1/magnetic.html>. Diakses tanggal 25 Januari 2014.
- Schrer, K. 2009. **Acetylsalicylic acid**. Wiley-Blackwell. ISBN 978-3-527-32109-4.
- Sen, S., Raja C., C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, & B. De. 2010. Free Radicals, Antioxidants, Disease and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 3.
- Settle, F. A. 1997. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. Prentice Hall PTR. New Jersey.
- Shalaby, E.A. & S.M.M. Shanab. 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr.J.Pharm. Pharmacol.* 7(10): 528-539.
- Shimada K., K. Fujikawa, K. Yahara, & T. Nakamura. 1992. Antioxidative Properties of Xanthone on The Auto Oxidation of Soybean in Cyclodextrin Emulsion. *J. Agr. Food. Chem.* 40: 945-48.
- Rieger, P. H. 2007. **Electron Spin Resonance, Analysis and Interpretation**. RSC Publishing. Cambridge.
- Siue. 2018. Carbonyl. <http://www.siue.edu/~tpatric/cbnyl.pdf>. Diakses 2 Juli 2018.
- Sneader, W. 2000. The discovery of aspirin: A reappraisal. *BMJ (Clinical research ed.)* 321(7276): 1591-1594.
- Soares J.R., T.C. Dinis, A.P. Cunha, & L.M. Almeida. 1997. Antioxidant Activity of Some Extracts of Thymus zygis. *Free. Radic. Res.* 26: 469-78.
- Szycher, M. 2013. **Szycher's Handbook of Polyurethanes**. Edisi kedua. CRC Press. Boca Raton

- Tancevski, I., A. Wehinger, W. Schgoer, P.E.S. Cuzzocrea, B. Foeger, J.R. Patsch, & A. Ritsch. 2006. Aspirin regulates expression and function of scavenger reseptop-BI in macrophages: studies in primary human macrophages and in mice. *The FASEB Journal* 20:
- Tim Uji Pestisida Jurusan Biologi FMIPA UNIBRAW. 2013. Hasil Pengujian Subkronis Kopi Balur pada Tikus Putih. Universitas Brawijaya, Malang.
- Trott, O. & A.J.Olson. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J.Comput. Chem.* 31(2): 455-461.
- Turnbull, C.M., D. McClure, A.G. Rossi & I.L. Megson. 2006. A novel electron paramagnetic resonance-based assay for prostaglandin H synthase-I activity. *J. Inflamm.* 3: 12.
- Wallace, A.C., R.A. Laskowski, & J.M. Thornton. 1995. LIGPLOT: a Program to Generate Schematic Diagrams of Protein- Ligand Interaction. *Protein Eng.* 8: 127-34.
- Walker, V. and W.H. Taylor. 1978. Ovalbumin Digestion by Human Pepsins 1, 3 and 5. *Biochem. J.* 176: 429-432.
- Wertz, J. E. & J. R Bolton. 1972. Electron Spin Resonance. McGraw Hill, New York.
- Widyarti, S., S. Permana & S. B. Sumitro. 2018. Kompleks Scavenger AOC (Aspirin-Ovalbumin-Caffeine) Melindungi Lambung dari Gastritis setelah Pemberian Aspirin Akut. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Belum Dipublikasikan.
- Wolber, G. & T. Langer. 2005. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filter. *J. Chem. Inf. Model* 45: 160-169.
- Xu, Y., Y. Gu & S. Y. Qian, 2012. An Advanced Electron Spin Resonance (ESR) Spin-Trapping and LC/ (ESR)/ MS Technique for the Study of Lipid Peroxidation. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 14648-14666.
- Zheng, J., K. Kwak, X. Chen, J.B. Asbury, & M.D. Fayer. 2006. Formation and Dissociation of Intra-Intermolecular Hydrogen-Bonded Solute-Solvent Complexes: Chemical Exchange Two-Dimensional Infrared Vibrational Echo Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 2977-2987.