

**PENGEMBANGAN FORMULA *MICRONEEDLE* FRAKSI DAUN
SESEWANUA (*Clerodendrum fragrans* Willd.) SEBAGAI KANDIDAT
ANTITROMBOSIS**

**DEVELOPMENT OF *MICRONEEDLE* FORMULA OF SESEWANUA LEAF
FRACTION (*Clerodendrum fragrans* Willd.) AS ANTITHROMBOSIS
CANDIDATE**



ZULFIAYU

N013211001



**PROGRAM STUDI DOKTOR FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**PENGEMBANGAN FORMULA *MICRONEEDLE* FRAKSI DAUN *SESEWANUA*
(*Clerodendrum fragrans* Willd.) SEBAGAI KANDIDAT ANTITROMBOSIS**

ZULFIAYU

N013211001



**PROGRAM STUDI DOKTOR FARMASI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**DEVELOPMENT OF MICRONEEDLE FORMULA OF SESEWANUA LEAF
FRACTION (*Clerodendrum fragrans* Willd.) AS ANTITHROMBOSIS
CANDIDATE**

**ZULFIAYU
N013211001**



**DOCTORAL STUDY PROGRAM
GRADUATE SCHOOL FACULTY OF PHARMACY
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR
2024**

**PENGEMBANGAN FORMULA *MICRONEEDLE* FRAKSI DAUN
SESEWANUA (*Clerodendrum fragrans* Willd.) SEBAGAI KANDIDAT
ANTITROMBOSIS**

**Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar doktor**

Program Studi Doktor Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

**ZULFIAYU
N013211001**

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR
FAKULTAS FARMASI SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**DEVELOPMENT OF MICRONEEDLE FORMULA OF SESEWANUA LEAF
FRACTION (*Clerodendrum fragrans* Willd.) AS ANTITHROMBOSIS
CANDIDATE**

Dissertation

As one of the requirements for achieving a doctoral degree

Pharmaceutical Sciences Study Program

Prepared and submitted by

ZULFIAYU
N013211001

To

DOCTORAL STUDY PROGRAM
GRADUATE SCHOOL FACULTY OF PHARMACY
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR
2024

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGEMBANGAN FORMULA MICRONEEDLE FRAKSI DAUN
SESEWANUA (*Clerodendrum fragrans* Willd.) SEBAGAI KANDIDAT
ANTITROMBOSIS**

**ZULFIAYU
N013211001**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang terbentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Farmasi Fakultas Farmasi Universitas
Hasanuddin

Pada tanggal 25 November 2024

Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Promotor,




Prof. Dr. Sartini, S.Si, M.Si, Apt.
NIP.19611111-198703-2001

Ko-Promotor,



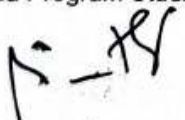
Prof. Andi Dian Permana, M.Si, Ph.D., Apt.
NIP. 19890205 201212 1 002

Ko-Promotor,



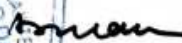
Prof. Yusnita Rifai, S.Si, M.Pharm, Ph.D, Apt
NIP. 19751117 200012 2 001

Ketua Program Studi,



Prof. Yusnita Rifai, S.Si, M.Pharm, Ph.D, Apt
NIP. 19751117 200012 2 001

Dekan Fakultas Farmasi,



Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

DISSERTATION


DEVELOPMENT OF MICRONEEDLE FORMULA OF SESEWANUA LEAF
FRACTION (*Clerodendrum fragrans* Willd.) AS ANTITHROMBOSIS
CANDIDATE

ZULFIAYU
N013211001

The dissertation has been examined and defended in front of the Dissertation
Examination Committee on the November 25, 2024, and declared eligible

Approved by:
Supervisor Commission,
Supervisor




Prof. Dr. Sartini, S.Si, M.Si, Apt.
NIP.19611111 198703 2001

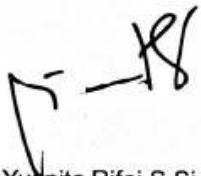
Co-supervisor,

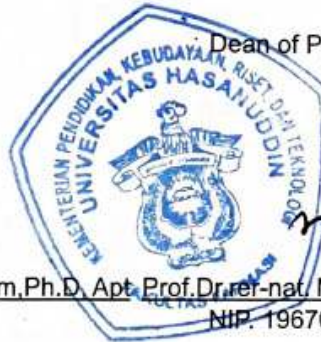
Co-supervisor,


 
Prof. Andi Dian Permana, M.Si, Ph.D, Apt. Prof. Yusnita Rifai, S.Si, M.Pharm, Ph.D, Apt
NIP. 19890205 201212 1 002 NIP. 19751117 200012 2 001

Head of Study Program,

Dean of Pharmacy Faculty,






Prof. Yusnita Rifai, S.Si, M.Pharm, Ph.D, Apt. Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001 NIP. 19670319 199203 2 002

**PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, Disertasi berjudul "Pengembangan Formula Microneedle Fraksi Daun *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) sebagai kandidat Antitrombosis" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim promotor (Prof. Dr. Sartini, S.Si, M.Si, Apt., Prof. Andi Dian Permana, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. dan Prof. Yusnita Rifai, M.Pharm, Ph.D, Apt.). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari isi disertasi ini telah dipublikasikan di **International Journal of Pharmaceutics**, Vol Volume 666 pp 1-17, 5 December 2024, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124766>, sebagai artikel dengan judul "Hispidulin-Rich Fraction of *Clerodendrum fragrans* Willd. (*Sesewanua*) Dissolving Microneedle as Antithrombosis Candidate: A Proof of Concept Study", dan dalam tahap revisi di **South African Journal of Botany** sebagai artikel dengan judul "Revealing the effect of *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) extract and fraction in the Treatment of Thrombosis using *In Silico* and *In vitro* Approaches". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan disertasi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 25 November 2024



Zulfiayu
NIM. N013211001

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahiim,

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala Rabb Semesta Alam Yang Maha Pengasih, Maha Penyayang, Maha Bijaksana, dan Maha Mengetahui segala sesuatu. Hanya kepada-Nya tempat meminta pertolongan, rahmat, dan karunia dalam meniti kehidupan yang fana ini. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada Rasulullah Muhammad Shallallahu 'alaihi wasallam, sebaik-baik teladan yang telah menyampaikan risalah kebenaran bagi seluruh umatnya, juga kepada keluarga, para sahabat, dan orang-orang yang mengikuti jalan Rasulullah hingga Hari Kiamat.

Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan studi dan memperoleh gelar doktor di Program studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Terima kasih atas segala dukungan dan doa. Penyusunan disertasi ini tentunya tidak lepas dari dukungan, bantuan, dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat, saya ingin menyampaikan rasa syukur dan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Sartini, S.Si., M.Si., Apt. selaku promotor yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan serta bantuan kepada penulis selama masa pelaksanaan penelitian serta penulisan disertasi.
2. Bapak Prof. Andi Dian Permana, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku co-promotor yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan serta bantuan kepada penulis selama masa pelaksanaan penelitian serta penulisan disertasi.
3. Ibu Prof. Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D. Apt. selaku co-promotor dan ketua program studi yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta bantuan bagi penulis dalam melaksanakan penelitian dan masa studi kuliah.
4. Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt., Nurhasni Hasan, M.Si, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt., Muhammad Akbar Bahar, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. dan Prof. Rani Sauriasari, M.Med.Sci., Ph.D., Apt. selaku penguji yang telah meluangkan waktunya, memberikan masukan dan saran terkait penelitian serta proses penyelesaian disertasi ini.
5. Dekan, Wakil Dekan, dosen-dosen, dan seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan dukungan, bimbingan, dan sarana yang telah diberikan sejak awal perjalanan kuliah hingga saat ini.
6. Kementerian Kesehatan yang telah memberikan Bantuan Tugas Belajar sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini.
7. Direktur, Wakil Direktur dan segenap jajaran civitas akademika Poltekkes Kemenkes Gorontalo, khususnya teman-teman dari Jurusan Farmasi, Ibu Fihrina, Nangsih, Fadli, Hartati, Arlan, Prisca, Ibu Vyani, Ibu Fadlun, Pak Paulus Pangalo, dan Usman yang telah memberikan kesempatan dan dorongan kepada penulis untuk melanjutkan pendidikan.

8. Tim peneliti Arlan K. Imran, Ysrafil, Fitriah Ayu Maghfirah, Lala, Hadi, Gustian Arafah, Siti Relistya Lasori, Yulan Husain, Widyawati Ibrahim, Nurrahmatia Utina, Nurain Panigoro, Iksandi Umar, Mein Tunggal, Putri Nur Fadilah Ahmad dan Siti Nur Fatimah S. Mohamad, dan mahasiswa Farmasi PolkesGo angkatan 2018-2021 yang selalu memberi dukungan kepada penulis dalam proses penelitian.
9. Dosen, Pranata Laboratorium Pendidikan dan staf laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Pak Mawan, Pak Nure, pak Habibie, ibu Nana, ibu Sumiati, ibu Cia, ibu Lia, pak Ical, ibu Ros, dan seluruh rekan-rekan Korps Asisten Farmasetika dan Biofarmaks.
10. Seluruh teman-teman peneliti sepejuangan, Tya Tuna, Afni, Irfan, Bisfain, Ria, Mitha, Adhel, Fitri, Komang, Ibu Asma, Novi, Pak Gerfan, Novi, Ijat, Deny, Citra, dan tim PKM Farmasetika. Terima kasih atas segala bantuannya.
11. Farmasi Unhas angkatan 94, Ibu Yusnita, Mukhriani, Siti Nur Alim, dan Faradiba, teman rasa saudara.

Kepada orangtua tercinta Ibu Hj. Zaenab (Almh.) dan Bapak H. Sapiun (Alm.), semoga Allah memasukkan Ibu dan Bapak ke dalam jannah-Nya. Saudara-saudara kami, Zulfiana, Zaedar Gazalba, Zulfiani, Zulfiati dan Zulfiatun, terimakasih atas dorongan dan doa selama penulis menempuh pendidikan S3. Kepada suami tercinta Muindar dan buah hati kami, Ahmad Syauqi Azzam, Hilwa Faradisa Taqiyyah, dan Muhammad Athaullah Faqih, semoga Allah senantiasa memasukkan kita dan anak cucu kita ke dalam barisan orang beriman yang teguh dalam Islam dan bersama kelak di surga-Nya.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas segala kebaikan dan bantuan yang telah diberikan oleh semua pihak. Semoga disertasi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Penulis,

Zulfiayu

ABSTRAK

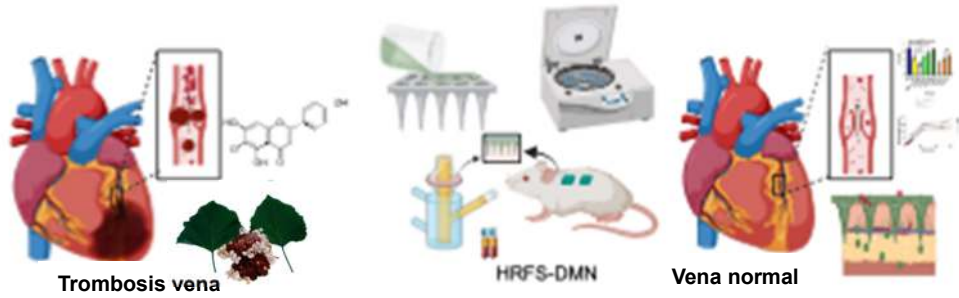
ZULFIAYU. **Pengembangan Formula *Microneedle* Fraksi Daun *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) sebagai Kandidat Antitrombosis** (dibimbing oleh Sartini, Andi Dian Permana dan Yusnita Rifai).

Latar belakang. Obat antitrombosis konvensional yang ada saat ini telah menyebabkan banyak efek samping, sehingga membuka peluang untuk pengembangan obat antitrombosis baru. Indonesia merupakan negara yang kaya dengan sumber daya alam, termasuk kandidat antitrombosis. *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) merupakan tanaman yang potensial dikembangkan sebagai Obat Herbal Terstandar antitrombosis melalui mekanisme antikoagulan dan antioksidan. Oleh karena itu, diperlukan suatu sistem penghantaran transdermal yang memudahkan obat masuk dengan mudah ke jaringan target. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining aktivitas antioksidan dan antikoagulan fraksi secara *in vitro* dan *in silico*, serta karakteristik dari fraksi terpilih daun *Sesewanua* dan mengembangkan formulasi preparasi, karakterisasi dan menguji aktivitas antikoagulan dan antioksidan dari *Dissolving Microneedle* (DMN) fraksi terpilih daun *Sesewanua*. **Metode.** Penelitian dibagi menjadi dua tahap, yakni: 1) ekstraksi, fraksinasi, uji *in vitro* dan *in silico* serta karakterisasi fraksi terpilih; dan 2) formulasi dengan menggunakan variasi konsentrasi polimer seperti polivinil alkohol (PVA), polivinil pirolidon K-30 (PVP), dan surfaktan non-ionik, karakterisasi dengan menggunakan metode X-ray Diffraction, FTIR, uji *ex vivo* untuk permeasi, uji *in vitro* untuk keamanan, dan uji *in vivo* untuk antikoagulan dan antioksidan (anti ICAM-1) pada tikus. **Hasil.** Uji *in vitro* dan *in silico* menunjukkan fraksi *Sesewanua* potensial sebagai antitrombosis yang diduga melalui mekanisme penghambatan AKT1, CASP3, ALB, and MMP9, jalur intrinsik dan ekstrinsik faktor koagulasi, dan antioksidan. Fraksi daun *Sesewanua* TEFS1 memiliki kandungan hispidulin sebesar $49,1 \pm 1,0\%$, sehingga disebut *Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua* (HRFS). Studi permeasi *ex vivo* HRFS-DMN menemukan bahwa sediaan melepaskan $203,73 \pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ hispidulin setelah 60 jam pada formulasi terbaik (F9). Pengujian aktivitas antikoagulan dan antioksidan HRFS-DMN secara *in vivo* pada tikus menunjukkan nilai aPTT dan PT yang lebih tinggi dan nilai ICAM-1 yang lebih rendah setelah 14 hari penggunaan. Tidak ditemukan perbedaan yang signifikan secara statistik antara efek dua dan empat buah HRFS-DMN dan injeksi heparin dengan dosis 200 IU per kilogram. Namun, terdapat perbedaan signifikan antara HRFS-DMN dengan kontrol negatif, oral, dan kuersetin sebagai kontrol positif pada aktivitas anti-ICAM. **Kesimpulan.** HRFS-DMN terbukti efektif dan aman digunakan sebagai antitrombosis melalui mekanisme antikoagulan dan antioksidan.

Kata kunci: *Dissolving Microneedle*, Polivinil Pirolidon, Polivinil Alkohol, *Prothrombin Time*, *activated Partial Thromboplastin Time*, *Intercellular Adhesion Molecule-1*.

ABSTRAK GRAFIS

Fraksi *Sesewanua* yang kaya Hispidulin yang diformulasi menjadi *Dissolving Microneedle* telah sukses mengurangi koagulasi darah dan disfungsi endotel



ABSTRACT

ZULFIAYU. **Development of *Sesewanua* Leaf Fraction (*Clerodendrum fragrans* Willd.) Microneedle Formula as Antithrombosis Candidate** (supervised by Sartini, Andi Dian Permana and Yusnita Rifai).

Background. Existing conventional antithrombotic drugs have caused many side effects, thus opening up opportunities for the development of new antithrombotic medicines. Indonesia is a country rich in natural resources, including antithrombosis candidates. *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) is a plant that can be developed as an antithrombotic agent of standardised herbal medicine with anticoagulant and antioxidant mechanism. Therefore, a transdermal delivery system is needed that allows the drug to enter easily into the target tissues. **Objective.** This study aims to screen the antioxidant and anticoagulant activities of fractions *in vitro* and *in silico*, as well as the characteristics of selected fractions of *C fragrans* Willd. leaves, and develop preparation formulations, characterisations, and anticoagulant and antioxidant activities of the Dissolving Microneedle (DMN) of selected fractions of *C. fragrans* Willd. leaves. **Methods.** The research was divided into two steps, i.e., 1) extraction, fractionation, *in vitro* and *in silico* tests, and characterisation of selected fractions; and 2) formulation using varying concentrations of polymers such as polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone K-30 (PVP), and non-ionic surfactants; characterisation using X-ray diffraction, FTIR; *ex vivo* tests for permeation; *in vitro* tests for safety; and *in vivo* tests for anticoagulant and antioxidant (anti-ICAM-1) in mice. **Results.** *In vitro* and *in silico* tests showed *C. fragrans* Willd. fractions to be potential antithrombotic agents that suggested through the mechanism of inhibition of AKT1, CASP3, ALB, MMP9, intrinsic and extrinsic pathway of coagulation factor, and antioxidant. *C. fragrans* Willd. leaf fraction TEFS1 has activity containing $49.1 \pm 1.0\%$ hispidulin, thus called Hispidulin Rich Fraction of *Sesewanua* (HRFS). The *ex vivo* permeation study of HRFS-DMN found that the preparation released 203.73 ± 3.22 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of hispidulin after 60 hours in the best formulation (F9). *In vivo*, anticoagulant and antioxidant activity testing of HRFS-DMN in mice showed higher aPTT and PT values and lower ICAM-1 values after 14 days of use. No statistically significant difference was found between the two and four effects of HRFS-DMN and heparin injection at a dose of 200 IU per kilogram. However, there were significant differences between HRFS-DMN with negative control, oral, and quercetin as positive control on anti-ICAM activity. **Conclusion.** HRFS-DMN is proven to be effective and safe to use as antithrombosis through anticoagulant and antioxidant mechanisms.

Keywords: *Dissolving Microneedle*, Polyvinyl Pyrrolidone, Polyvinyl Alcohol, *Prothrombin Time*, *activated Partial Thromboplastin Time*, *Intercellular Adhesion Molecule-1*

GRAPHICAL ABSTRACT

Hispidulin Rich Fraction of Sesewania-Dissolving Microneedles (HRFS-DMN) was successfully applied to reduce blood coagulation and endothelial dysfunction



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	vi
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	viii
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penulisan	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Ruang Lingkup	3
1.6 Kebaruan Penelitian.....	4
BAB II EFEK EKSTRAK DAN FRAKSI SESEWANUA (Clerodendrum fragrans WILD.) DALAM PENGOBATAN TROMBOSIS MENGGUNAKAN PENDEKATAN IN SILICO DAN IN VITRO	5
2.1 Abstrak.....	5
2.2 Pendahuluan.....	5
2.3 Metode Penelitian	7
2.4 Hasil dan Pembahasan	15
2.5 Kesimpulan	39
DAFTAR PUSTAKA.....	41
BAB III DISSOLVING MICRONEEDLE FRAKSI Clerodendrum fragrans WILD.(SESEWANUA) YANG KAYA HISPIDULIN SEBAGAI KANDIDAT ANTITROMBOSIS: STUDI PEMBUKTIAN KONSEP	57
3.1 Abstrak.....	57

3.2	Pendahuluan	57
3.3	Metode Penelitian	59
3.4	Hasil dan Pembahasan	69
3.5	Kesimpulan	84
BAB IV PEMBAHASAN UMUM		101
DAFTAR PUSTAKA.....		104
BAB V KESIMPULAN		120
LAMPIRAN		121

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
2.1. Nilai Rf noda fraksi Sesewanua	19
2.2. Skrining fitokimia simplisia, ekstrak, dan fraksi daun Sesewanua.....	20
2.3. Panjang gelombang dan gugus fungsional pada TEFS1	27
2.4. Kromatogram UFLC menggunakan UFLC	27
2.5. Analisis topologi dari 29 protein terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa Sesewanuwa.....	30
2.6. Pengelompokan yang mengindikasikan modul-modul jaringan interaksi protein-protein dari target umum senyawa sesewanua pada trombosis yang dianalisis dengan algoritma MCODE	32
2.7. 10 protein potensial trombosis yang ditargetkan oleh sesewanua dengan masing-masing empat nilai parameter seperti derajat, antara, kedekatan, MNC	33
2.8. Docking dari empat protein potensial terkait trombosis dengan senyawa sesewanua	36
3.1. Formula DMN.....	61
3.2. Skema Penilaian untuk Pengujian Iritasi menggunakan metode uji HET-CAM66	
3.3. Skor iritasi sistem klasifikasi HET-CAM.....	67
3.4. Jumlah sampel plasma dan reagen uji	68
3.5. Densitas, LOD, and drug content recovery HRFS-DMN (Rata-rata \pm SD, n =3)77	
3.6. Hasil uji hemolitik HRFS dan HRFS-DMN	80
3.7. Skor HETCAM IS HRFS-DMN.....	80
3.8. Uji in vivo aktivitas antikoagulan dan anti ICAM-1 HRFS-DMN.....	82

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
2.1. Profil KLT A. EES, B. fraksi 1) HEFS, 2) TEFS, 3) MEFS	17
2.2. Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi menggunakan DPPH	22
2.3. Flavonoid total ekstrak dan fraksi Sesewanua	21
2.4. Waktu koagulasi in vitro 50 mg/mL ekstrak dan fraksi daun Sesewanua dibandingkan dengan negatif (akuades, AQU) dan kuersetin positif, QCT.	22
2.5. Mikroskop apusan darah fraksi Sesewanua; a. kontrol negatif; b. heparin, c: EDTA; d. kuersetin; e. EES, f. HEFS1; g. HEFS2; h. HEFS3; i. TEFS1; TEFS2; k. TEFS3; l. TEFS4; m. MEFS1; n. MEFS2; o. MEFS3.	23
2.6. PT dan INR PT 50 mg/mL ekstrak dan fraksi daun Sesewanua dibandingkan dengan negatif (AQU, akuades) dan positif quercetin QCT dan heparin HEP	24
2.7. aPTT dan aPTT 50 mg/mL ekstrak dan fraksi daun Sesewnua dibandingkan dengan negatif (AQU, akuades) dan positif quercetin QCT dan positif quercetin QCT dan heparin HEP.	25
2.8. Spektra TEFS1 dibandingkan dengan Kuersetin dan Hispidulin	26
2.9. Spektra FTIR TEFS1	26
2.10. Spektra UFLC TEFS1	27
2.11. Spektra XRD TEFS1	28
2.12. Target potensial senyawa Sesewanua dalam trombosis.....	29
2.13. PPI dari 116 protein potensial pada trombosis yang ditargetkan oleh fitokostituen sesewanua yang dibangun oleh STRING.....	30
2.14. Analisis topologi protein target potensial pada trombosis yang ditargetkan oleh senyawa sesewanua (A) 116 protein potensial, (B) 29 protein node dengan 230 node setelah penyaringan dengan tiga parameter DC, BC dan CC (C) 29 protein kunci yang dinilai berdasarkan derajat (ungu adalah nilai DC yang lebih tinggi).....	30
2.15 10 protein target inti teratas yang diidentifikasi berdasarkan (A) Derajat, (B) Keantaraan (C) Kedekatan dan (D) MNC, (E) Tumpang tindih dari 5 target potensial peotein terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa Sesewanua	34
2.16. Pengayaan ontologi gen dan jalur KEGG dari protein kluster fungsional utama trombosis yang ditargetkan oleh senyawa Sesewanua (p-value 0,01). (A) 20 besar proses biologis (B) 20 besar komponen seluler (C) 20 besar fungsi molekuler (D) 20 besar jalur KEGG. Ukuran titik-titik menunjukkan jumlah gen yang terkait. Warna menggambarkan nilai-p.	34
2.17. Peta jalur terpadu senyawa sesewanua dalam pengobatan trombosis terutama pada jalur pensinyalan PI3K-AKT. Tanda merah adalah protein target fungsional utama dari senyawa Sesewanua.....	35
2.18. Hasil docking 3D dan 2D antara protein utama terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa sesewanua dengan skor terbaik. (A) AKT1-	

isoverbascoside (B) CASP3-isoverbascoside (C) ALB-Hispidulin (D) MMP9-isoverbascoside.....	35
2.19. RMSD, RMSF dan Radius Girasi kompleks protein-ligan terpilih (daun sesewanua) selama stimulasi dinamik molekuler (A) Isoverbascoside-AKT1 (B) isoverbascoside-CASP3.....	39
3.1. Prosedur kerja pembuatan HRFS-DMN	62
3.2. Pengujian in vivo HRFS-DMN.....	68
3.3. (A) Morfologi HFRS-DMN B) Gambar representatif formulasi DMN (a) F5, (b) F8, (c) F9, (d) F11, dan (e) F12 sebelum uji kekuatan mekanik, dan (f) F5, (g) F8, (h) F9, (i) F11, dan (j) F12 setelah uji kekuatan mekanik (C) penurunan tinggi jarum DMN (rata-rata \pm SD, n=3).....	70
3.4. (A) Sifat insersi HRFS-DMN (rata-rata \pm SD, n=3), (B) Parafilm M [®] setelah uji mekanis	71
3.5. pH permukaan HRFS-DMN (rata-rata \pm SD, n=3).....	72
3.6. MAA pada RH 69 (rata-rata \pm SD, n=3).....	73
3.7. Hasil pengujian WVTR (rata-rata \pm SD, n=3).....	73
3.8. Spektrum FTIR HRFS dan HRFS-DMN.....	74
3.9. Spektra XRD HRFS dan HRFS-DMN	75
3.10. Pelarutan HRFS-DMN dalam kulit tikus (A) Morfologi jarum HRFS-DMN, (B) Waktu melarut dalam menit (Rata-rata \pm SD, n = 3).....	76
3.11. Profil permeasi HRFS-DMN (Rata-rata \pm SD, n = 3)	78
3.12. Grafik hasil uji retensi HRFS-DMN secara ex vivo (Rata-rata \pm SD, n = 3, ket. * = berbeda signifikan (p < 0.05))	78
3.13. Hasil uji hemolitik HRFS-DMN	79
3.14. Gambar HETCAM dari HRFS dalam bentuk suspensi	81
3.15. Aktivitas in vivo pada tikus (A) PT, (B) aPTT (rata-rata \pm SD, n = 3).....	83
3.16. Aktivitas in vivo pada tikus (A) ICAM-1 (rata-rata \pm SD, n = 3), (B) HRFS-DMN melekat pada permukaan dorsal tikus, (C) HFRS-DMN menembus kulit tikus.	84

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Urut	Halaman
Lampiran 1. Kerangka teori	121
Lampiran 2. Panjang gelombang maksimum dan kurva baku	124
Lampiran 3. Dokumentasi penelitian	126
Lampiran 4. Perhitungan	129

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan Keterangan
aPTT	<i>Activated Partial Tharombin Time</i>
Aqu	<i>Akuades</i>
b/b	Bobot dalam bobot
bpj	Bobot per juta
CVD	Cardio Vascular Disease
DMN	Dissolving Microneedle
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EES	Extract Ethanol of <i>Sesewanua</i>
ELISA	<i>Enzym-Linked Immunosorbent Assay</i>
HEFS	Hexan Ethyl Acetate Fraction of <i>Sesewanua</i>
HEP	Heparin
HETCAM	The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane
HIS	Hispidulin
HRFS	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua</i>
HRFS-DMN	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Dissolving Microneedle</i>
HRFS-DMN1	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Dissolving Microneedle 1</i>
HRFS-DMN2	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Dissolving Microneedle 2</i>
HRFS-DMN4	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Dissolving Microneedle 4</i>
HRFSFree-DMN	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua Free-Dissolving Microneedle</i>
HRFS-O1	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Oral1</i>
HRFS-O2	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Oral2</i>
HRFS-O4	<i>Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua-Oral4</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitor Concentration₅₀</i>
ICAM-1	<i>Inter Cellular Adhesive Molecule-1</i>
MEFS	<i>Methanol Ethyly Fraction of Sesewanua</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PE	<i>Pulmonary Emboli</i>
PL-127	<i>Pluronic F127</i>
PT	<i>Prothrombin Time</i>
PVA	<i>Polyvinyl alcohol</i>
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
OHT	<i>Obat Herbal Terstandar</i>
Que	<i>Quercetine</i>
	<i>Obat Herbal Terstandar</i>
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
SS	<i>Simplisia Sesewanua</i>
TE	<i>Thrombo Emboli</i>
TEFS	<i>Toluene Ethil Acetate Fraction of Sesewanua</i>
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UV	<i>Ultra violet</i>

Vis

| *Visible*

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskular (PKV) merupakan faktor utama penyebab kematian di seluruh dunia. Pada tahun 2019, sekitar 17,9 juta orang meninggal akibat PKV, yang mewakili 32% dari angka kematian di seluruh dunia. Di antara kematian ini, 85% disebabkan oleh kerusakan serebrovaskular dan infark miokard. Trombosis adalah faktor yang berkontribusi besar terhadap PKV (World Health Organization, 2024). Trombosis disebabkan oleh aliran darah yang lambat, hiperkoagulabilitas darah, dan kerusakan sel endotel (*Virchow's Triad*). Tromboemboli (TE) merupakan kondisi vaskular ditandai dengan produksi gumpalan darah yang berlebihan, dan menyebabkan penyumbatan arteri darah dan menjadi salah satu penyebab aliran darah yang lambat. Setelah infark dan stroke, kondisi TE menempati posisi ketiga sebagai kondisi kardiovaskular akut yang paling umum. Kondisi TE menyebabkan ketidaknyamanan, kematian, dan beban ekonomi (Almeida et al., 2019; Bauersachs et al., 2019; Kabashneh et al., 2020; Kalaitzopoulos et al., 2022; Lutsey & Zakai, 2023; Murphy et al., 2020).

Antikoagulan dapat mencegah trombosis dengan menghentikan produksi faktor pembekuan dan mencegah trombosit saling menempel. *Direct Thrombin Inhibitor* (DTI) seperti dabigatran, argatroban, dan bivalirudin memblokir aktivitas trombin, sedangkan pengencer darah tidak langsung seperti heparin dan heparin dengan berat molekul rendah memblokir faktor Xa. Namun, obat-obat ini memiliki keterbatasan, seperti rentang terapi yang terbatas, waktu eliminasi yang lama, reaksi yang merugikan, dan interaksi dengan obat lain. Antioksidan juga banyak digunakan pada pencegahan trombosis sebagai upaya untuk menjaga kesehatan sel endotel pembuluh darah. Beberapa antioksidan yang digunakan untuk pencegahan PKV adalah likopen pada tomat, coenzyme Q10 (CoQ10), flavonoid, carotenoid, dan resveratro. Bahan alam seperti ganggang hijau, ganggang merah, ganggang coklat, fraksi buah *Camellia osmantha*, ekstrak buah *Malphighia emarginata*, ekstrak bawang putih, ekstrak bawang merah, dan ekstrak stroberi telah menunjukkan aktivitas antikoagulan yang menjanjikan. Hal ini memberi arah pada pengembangan Obat Herbal Terstandar (OHT) antitrombosis dengan mekanisme mencegah kerusakan sel endotel dengan menghambat spesies oksigen reaktif (bersifat antioksidan) dan sekaligus dapat memiliki aktivitas antikoagulan. Salah satu tanaman obat di Indonesia yang menjanjikan untuk digunakan sebagai antitrombosis dengan 2 mekanisme tersebut adalah *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) (Andrade et al., 2013; Ascenso et al., 2013; Choi et al., 2015; Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2017; Gryglewski et al., 1987; Jumiarni & Komalasari, 2017; Ko et al., 2018; Lip et al., 2019; Milling & Ziebell, 2020; Młynarska et al., 2024; Muro & Muzykantov, 2005; Tentu et al., 2022).

Sesewanua merupakan tanaman obat yang tersebar di Indonesia, khususnya di pulau Sulawesi bagian Utara. *Sesewanua* merupakan tanaman obat yang digunakan secara empiris sebagai antipiretik, anti inflamasi, anti lebam, anti reumatoid, anti

kanker, dan antioksidan. *Sesewanua* mengandung hispidulin, verbascoside, isoverbacoside, cornoside, decaffeoyl, icariside, lupeol, dan rengyolone. Senyawa hispidulin, verbacosida dan isoverbacosida pada tanaman *Sesewanua* dapat dijadikan kandidat antirombosis. Fraksi dari *Sesewanua* ini potensial dikembangkan sebagai OHT PKV melalui mekanisme antikoagulan dan antioksidan. Namun, fraksi tidak bisa diberikan sebagai *free drug*, sehingga perlu untuk diformulasikan ke dalam sistem penghantaran obat. Hispidulin sebagai salah satu senyawa dalam fraksi *Sesewanua* memiliki kelarutan yang terbatas dalam air sehingga sulit untuk diformulasikan ke dalam bentuk sediaan oral seperti tablet atau kapsul. Penghantaran melalui intravena (IV) memiliki kekurangan seperti membutuhkan alat medis berupa jarum yang dapat menimbulkan nyeri, tenaga ahli medis serta limbah medis. Oleh karena itu, sangat penting untuk merancang metode penghantaran obat yang tepat salah satu sistem penghantaran obat yang mampu mengatasi masalah tersebut adalah sistem penghantaran melalui kulit atau *transdermal drug delivery*. Sistem ini mampu untuk menghantarkan obat melintasi penghalang kulit serta secara efektif dan mencapai jaringan target yang dituju. *Microneedle* merupakan salah satu bentuk sediaan transdermal yang terbukti dapat mengatasi keterbatasan dalam pendekatan konvensional (Barung et al., 2021; Butarbutar, 2013; Irawati, D; Kinho, 2015; K. Liu et al., 2020; Nonke et al., 2017; Sabar et al., 2015; Sapiun et al., 2023; Sapiun, Pangalo, Imran, et al., 2020; Simbala, 2007; Wahba et al., 2011).

Microneedles terdiri dari jarum berukuran mikro yang tersusun pada *patch* kecil. Sediaan ini ditempelkan ke kulit dan dapat dengan mudah berpenetrasi melalui stratum korneum yang merupakan *barrier* terbesar penetrasi obat melalui kulit. Obat dapat memasuki lapisan luar kulit dan lapisan di bawahnya untuk melepaskan obat sehingga dapat mencapai sirkulasi sistemik. Sediaan ini dapat diaplikasikan pada kulit dengan invasi minimal, tanpa rasa sakit dan tanpa menyebabkan pendarahan (Amarnani & Shende, 2022; Donnelly et al., 2012).

Dissolving microneedles (DMN) adalah polimer yang larut dalam air yang memungkinkan penghantaran obat yang ditargetkan ke lapisan kulit, meningkatkan efikasi dan mengurangi dosis. Ketika diaplikasikan ke dalam kulit, DMN larut sepenuhnya, menciptakan rongga untuk masuknya obat dan cairan interstisial. Tidak seperti sediaan injeksi, penggunaan metode ini dapat mencegah residu yang tajam (Aisyah et al., 2024; A. P. D. Putri et al., 2024; Stephanie et al., 2024). DMN dibuat menggunakan polimer yang stabil secara mekanis, biokompatibel, larut dalam kulit, dan stabil sebagai pembawa obat. Polivinil alkohol (PVA) digunakan dalam pembuatan *microneedles* karena PVA memiliki kemampuan biodegradasi dan larut dalam air. Penggabungan PVA dan polivinil pirolidon (PVP) dalam *microneedles* diharapkan dapat memberikan kekuatan mekanik yang lebih baik. DMN merupakan bahan pembawa yang baik untuk obat-obat yang memiliki kelarutan yang rendah dalam air. Surfaktan non ionik ditambahkan dalam formulasi untuk meningkatkan efisiensi penghantaran intradermal obat dengan kelarutan rendah (Aisyah et al., 2024; Anjani et al., 2022; Hidayatullah et al., 2023; Teodorescu et al., 2019).

Terdapat beberapa studi tentang pembuatan *microneedle* dari bahan alam. Studi oleh Ding et al, 2024 berhasil membuat *microneedle* dari getah *Artemisia argyi*. Yang,

2023 membuat *microneedle* dari Yunnan Baiyao yang merupakan kombinasi ekstrak tanaman *Panax notoginseng* (Sanqi), *Rhizoma Paridis* (Chonglou), *Radix Aconiti kusnezoffii* (Caowu), *Borneolum syntheticum* (Shexiang), dan *Forest Musk*. Frydman, 2020 juga berhasil membuat *microneedle* dari madu Manuka. Ning, 2021 membuat DMN menggunakan ekstrak shikonin sebagai bahan aktif. Chi, 2021 berhasil memformulasikan *The Chinese herb Microneedle* (CHMN) dengan menggabungkan ekstrak herbal *Premna microphylla* dan *Centella asiatica*. Dia, 2024 membuat *microneedle* dari 7 ekstrak herbal Cina ke dalam *microneedles*. Hal tersebut menjadi acuan dalam memformulasi fraksi daun *Sesewanua* dalam bentuk sediaan DMN (Chi et al., 2021; Ding et al., 2024; Frydman et al., 2020; He et al., 2024; Ning et al., 2021; Yang et al., 2023).

Berdasarkan pemaparan di atas, dilakukan inovasi untuk melakukan skrining aktivitas antikoagulan dan antioksidan fraksi daun *Sesewanua* secara *in vitro* dan *in silico*, mengkarakterisasi fraksi terpilih dan mendesainnya dalam bentuk *Dissolving Microneedle*. Dalam penelitian ini dilakukan optimasi basis variasi polimer PVA dan PVP dan jenis surfaktan non ionik untuk mendapatkan desain formula terbaik. Selanjutnya dilakukan evaluasi, karakterisasi, uji *ex vivo*, uji *in vitro*, dan uji *in vivo*.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana skrining aktivitas antioksidan dan antikoagulan secara *in vitro* dan *in silico*, serta karakteristik dari fraksi terpilih daun *Sesewanua*?
- b. Bagaimana formulasi, preparasi, karakterisasi dan aktifitas antikoagulan dan antioksidan dari *microneedle* fraksi terpilih daun *Sesewanua*?

1.3 Tujuan Penulisan

- a. Untuk mempelajari aktivitas antioksidan dan antikoagulan secara *in vitro* dan *in silico* serta karakteristik fraksi terpilih daun *Sesewanua*.
- b. Untuk melakukan formulasi, preparasi, karakterisasi dan menentukan aktifitas antikoagulan dan antioksidan *microneedle* fraksi terpilih daun *Sesewanua*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan menjadi sebagai sumber referensi ilmiah untuk pengembangan sediaan obat antitrombosis. Hasil dari penelitian ini diharapkan menjadi salah satu penemuan sediaan antitrombosis baru dari bahan alam menggunakan transdermal *drug delivery system*. Selain itu, penelitian ini dapat dijadikan sumber data ilmiah bagi penelitian selanjutnya dalam pengembangan sediaan antitrombosis pada tahapan uji klinik.

1.5 Ruang Lingkup

Ruang lingkup penelitian ini adalah melakukan ekstraksi, fraksinasi, uji *in vitro* dan *in silico*, karakterisasi fraksi terpilih dan melakukan formulasi, karakterisasi, uji *ex vivo*, *in vitro* serta uji *in vivo* sediaan *microneedle* senyawa terpilih.

1.6 Kebaruan Penelitian

Kebaruan penelitian ini adalah :

- a. didapatkannya fraksi terpilih daun *Sesewanua* yang potensial sebagai antitrombosis
- b. didapatkannya gambaran prediksi *network pharmacology* senyawa daun *Sesewanua* sebagai antitrombosis yang diverifikasi melalui simulasi molekuler
- c. didapatkannya sediaan *Dissolving Microneedle* fraksi terpilih yang stabil secara fisik, aman, dan berpotensi digunakan sebagai kandidat antitrombosis melalui 2 mekanisme, yaitu: antikoagulan dan antioksidan.

BAB II
EFEK EKSTRAK DAN FRAKSI SESEWANUA (*Clerodendrum fragrans*
Willd.) DALAM PENGOBATAN TROMBOSIS MENGGUNAKAN
PENDEKATAN *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

2.1 Abstrak

Latar belakang. Trombosis merupakan penyebab utama penyakit jantung iskemik, stroke iskemik, dan infark miokard. Obat antitrombosis yang tersedia menimbulkan efek samping yang banyak. Oleh karena itu perlu dikembangkan Obat Herbal Terstandar menggunakan tanaman obat asli Indonesia. Sesewanua merupakan tanaman obat yang berpotensi digunakan sebagai antitrombosis melalui mekanisme anti koagulan dan antioksidan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan aktivitas antikoagulan daun *Sesewanua* sebagai kandidat obat antitrombosis. **Metode.** Daun *Sesewanua* diekstraksi dengan etanol 96% dan difraksinasi dengan campuran n-heksan, toluen, metanol dan etil asetat dengan berbagai variasi. Ekstrak dan fraksi-fraksi tersebut dievaluasi untuk mengetahui kandungan flavonoid total, antioksidan, dan aktivitas antikoagulan pada konsentrasi akhir 50 mg/mL. **Hasil.** Ekstrak dan fraksi memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Mayoritas fraksi dan ekstrak memperpanjang waktu koagulasi, HEFS2 dan HEFS3 memiliki efek antikoagulan yang signifikan melalui peningkatan PT (jalur ekstrinsik), TEFS2 memperpanjang aPTT (jalur intrinsik), serta TEFS1 dan MEFS1 untuk keduanya (PT dan aPTT). Efek antikoagulan dan antioksidan yang kuat dari TEFS1 menunjukkan signifikansi farmakologisnya sebagai obat antikoagulan herbal untuk pencegahan dan/atau pengobatan gangguan kardiovaskular terkait trombosis. Hasil karakterisasi yang dilakukan terhadap TEFS1 ditemukan adanya senyawa hispidulin sebanyak 49,1%. Berdasarkan uji *in silico network pharmacology*, efek antitrombosis ini diduga dilakukan oleh senyawa *Sesewanua* melalui mekanisme penghambatan 4 *putative* protein trombosis yakni AKT1, CASP3, ALB, dan MMP9. Hasil ini dibuktikan lebih lanjut melalui studi docking molekuler ketiga senyawa sesewanuwa seperti hispidulin, verbascoside, dan isoverbascoside memberikan afinitas ikatan stabilitas yang baik pada ke empat protein tersebut. **Kesimpulan.** Studi eksperimental dan komputasi membuktikan bahwa fraksi daun *Sesewanua* dapat digunakan sebagai kandidat antitrombosis melalui mekanisme antikoagulan dan antioksidan.

Kata kunci: *Clerodendrum fragrans*, pembekuan darah, *Prothrombin Time*, *activated Partial Thromboplastin Time*

2.2 Pendahuluan

Pembekuan (koagulasi) darah yang berlebihan menyebabkan oklusi pembuluh darah, yang umumnya dikenal sebagai tromboemboli vena (TEV). TEV secara klinis bermanifestasi sebagai trombosis vena dalam dan emboli paru (EP). Tromboemboli (TE) menyebabkan morbiditas dan mortalitas. TE merupakan penyebab 1 dari 4

kematian di dunia. TE juga menimbulkan beban ekonomi yang tinggi dan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya usia harapan hidup dan usia populasi. Stres oksidatif vaskular, trombosis, dan inflamasi merupakan proses yang tidak dapat dipisahkan yang meningkatkan morbiditas dan mortalitas pada kondisi kardiovaskular. Tingginya prevalensi dan mortalitas penyakit-penyakit ini menunjukkan pentingnya obat yang efektif baik dalam tahap pencegahan maupun pengobatan penyakit (Bauersachs et al., 2019; Kabashneh et al., 2020; Kalaitzopoulos et al., 2022; Konstantinides et al., 2020; Lutsey & Zakai, 2023).

Menurut Virchow's Triad, aliran darah yang lamban, hiperkoagulabilitas darah, dan kerusakan sel endotel adalah tiga penyebab utama trombosis. Trombosis dapat dicegah dengan mengambil tindakan untuk mencegah satu atau lebih dari kondisi ini. Antikoagulan dapat menghentikan produksi faktor pembekuan dalam jalur pembekuan dan/atau menghentikan trombosit agar tidak saling menempel. Hal ini menghentikan pembekuan darah dalam pembuluh darah dan menurunkan risiko trombosis. Mekanisme kerja sebagian besar antikoagulan melibatkan penghambatan beberapa faktor pembekuan. Antikoagulan dapat mencegah trombosis dengan menghentikan produksi faktor pembekuan dan mencegah trombosit saling menempel. *Direct Thrombin Inhibitor* (DTI) seperti dabigatran, argatroban, dan bivalirudin memblokir aktivitas trombin, sedangkan pengencer darah tidak langsung seperti heparin dan heparin dengan berat molekul rendah memblokir faktor Xa. Namun, obat-obat ini memiliki keterbatasan, seperti rentang terapi yang terbatas, waktu eliminasi yang lama, reaksi yang merugikan, dan interaksi dengan obat lain. Antioksidan juga banyak digunakan pada pencegahan trombosis sebagai upaya untuk menjaga kesehatan sel endotel pembuluh darah. Beberapa antioksidan yang digunakan untuk pencegahan PKV adalah likopen pada tomat, coenzyme Q10 (CoQ10), flavonoid, carotenoid, dan resveratro. Bahan alam seperti ganggang hijau, ganggang merah, ganggang coklat, fraksi buah *Camellia osmantha*, ekstrak buah *Malpighia emarginata*, ekstrak bawang putih, ekstrak bawang merah, dan ekstrak stroberi telah menunjukkan aktivitas antikoagulan yang menjanjikan. Hal ini memberi arah pada pengembangan Obat Herbal Terstandar (OHT) antitrombosis dengan mekanisme mencegah kerusakan sel endotel melalui penghambatan ROS (bersifat antioksidan) dan aktivitas antikoagulan. Salah satu tanaman obat di Indonesia yang menjanjikan untuk digunakan sebagai antitrombosis dengan 2 mekanisme tersebut adalah *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.) (Andrade et al., 2013; Ascenso et al., 2013; Choi et al., 2015; Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2017; Gryglewski et al., 1987; Jumiarni & Komalasari, 2017; Ko et al., 2018; Lip et al., 2019; Milling & Ziebell, 2020; Młynarska et al., 2024; Muro & Muzykantov, 2005; Tentu et al., 2022).

Sesewanua merupakan tanaman obat yang digunakan secara empiris sebagai antipiretik, anti inflamasi, anti lebam, anti reumatoid, anti kanker, dan antioksidan. *Sesewanua* mengandung hispidulin, verbascoside, dan isoverbacoside. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa potensial yang memiliki aktivitas antitrombotis. Fraksi *Sesewanua* berpotensi untuk dikembangkan menjadi Obat Herbal Terstandar sebagai kandidat antitrombosis (Liu et al., 2020).

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk memahami aktivitas antioksidan dan antikoagulan fraksi secara *in silico* dan *in vitro* serta melakukan karakteristik fraksi terpilih daun *Sesewanua*.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fitokimia dan Farmakologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Gorontalo di Gorontalo, Laboratorium Obat Tradisional BPOM di Gorontalo, Laboratorium Kimia Universitas Sam Ratulangi di Manado, dan Laboratorium Rumah Sakit Umum Daerah Aloe Saboe di Gorontalo.

Alat- alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Iwaki[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), mikro pipet, Spektroskopi *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) Shimadzu[®], *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC) Shimadzu[®], mikroskop optik (Olympus CZ23), *Coagulation analyzer* (Coatron M2, Teco[®]), alat ekstraksi Maserasi, Chamber, Spektrofotometer UV-Vis AMV11[®], Spektrofotometer UV 1900i Shimadzu[®], pelat Kromatografi lapis tipis, Kromatografi kolom, lemari asam ESCO[®], dan XRD -7000 X Ray Diffractometer.

Bahan- bahan pada penelitian ini adalah daun *Sesewanua* (*Clerodendrum fragrans* Willd.), Hispidulin (purity $\geq 97\%$) dari Sigma-Aldrich, Kuersetin, Etanol 96%, Toluena, Etil Asetat, Hexan1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, reagen TEClot PT-S (TECO) *Prothrombin Time* (PT) dan reagen *activated Partial Thromplastin Time* (aPTT). Semua reagen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *analytical grade*.

2.3.1 Penyiapan sampel

2.3.1.1 Pembuatan simplisia daun *Sesewanua*

Sampel daun *Sesewanua* yang diambil dari Desa Ilotidea, Kecamatan Tilango, Kabupaten Gorontalo sebanyak 5 kg yang telah dikumpulkan, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dari sampel. Daun dirajang menjadi potongan yang kecil-kecil, dan dikeringanginkan kembali di udara terbuka. Simplisia yang telah kering kemudian ditimbang berat sampel selanjutnya dihitung % kadar air dari simplisia. Sampel disimpan dalam wadah plastik tertutup dan disimpan pada suhu kamar. Penentuan kadar air pada simplisia menggunakan alat *moisture balance* (Fikriyah & Nasution, 2021)

2.3.1.2 Pembuatan ekstrak etanol daun *Sesewanua*

Ekstrak etanol daun *Sesewanua* dibuat dengan metode maserasi. Ditimbang simplisia daun sebanyak 1.500 g, lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 15 L dengan perbandingan 1:10 (w/v) sampai simplisia benar-benar terendam. Ekstraksi dilakukan selama 72 jam terlindung dari cahaya dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Pada hari ke-2 dan ke-3 pelarut disaring untuk remaserasi sehingga diperoleh 3 filtrat untuk masing-masing pelarut. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. (A.R.Abubakar & Mainul Haque, 2020). Rumus rendemen ekstrak maserasi (Senduk et al., 2020; Sulastri et al., 2020):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.1.3 Fraksinasi daun *Sesewanua* menggunakan kromatografi kolom

Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 10 g ekstrak dan ditambahkan etanol sebanyak 5 ml. Selanjutnya, silika gel₆₀ sebanyak 200 g dibuburkan menggunakan n-hexan secukupnya, dimasukkan kertas saring dan kapas kedalam buret kolom kromatografi, kemudian dimasukkan silika gel₆₀ yang sudah jadi bubuk. Setelah seluruh bubuk silika gel₆₀ masuk, fase diam dielus sampai terjadi pemampatan dengan sempurna. Ekstrak dimasukan pada bagian atas kolom yang disebar secara merata lalu ditambahkan eluen. Kemudian dielus mulai dari kepolaran rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan dan kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Pemisahan terhadap ekstrak menggunakan tiga macam fase gerak, yaitu: n-hexan: etilasetat, metanol: etil asetat, dan toluen: etil asetat menggunakan kromatografi kolom dengan dengan berbagai rasio (10:0), (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9) dan (0:10). Rumus rendemen fraksi (Gustari, 2021) :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Fraksi}}{\text{Berat Ekstrak}} \times 100\% \quad (2)$$

2.3.1.4 Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) dipotong ukuran 5 cm dengan garis batas bawah dan atas 1 cm. Plat KLT diaktivasi dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Fraksi ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Setelah kering lalu dimasukan kedalam bejana. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform, aseton : asam formiat dengan perbandingan 10:2:1. Bejana dijenuhkan selama 4 menit. Bila fasa gerak mencapai batas yang ditentukan, plat diangkat dan dikeringkan di udara terbuka. Noda yang terbentuk diamati pada lampu UV 366 nm. Apabila noda yang tampak pada lampu UV sama, maka dilakukan penggabungan sehingga dapat menyederhanakan isolat yang diperoleh (Mutmainnah et al., 2017).

2.3.2 Skrining fitokimia

Persiapan sampel untuk identifikasi kualitatif dilakukan dengan menimbang ekstrak dan fraksi ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam campuran 50 ml etanol 96% dan 50 ml air.

- a) Uji Alkaloid Reagen Mayer: Larutan sampel diambil 2 ml, kemudian ditambahkan 2 tetes mayer, hasil positif dengan terbentuknya endapan putih. Reagen dragendorff: Larutan sampel diambil 2 ml, kemudian ditambahkan 2 tetes dragendorff, hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat.
- b) Uji Tanin: 2 ml ekstrak ditambahkan dengan 10 tetes FeCl₃ 10%. Ekstrak positif mengandung tanin apabila menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman.
- c) Uji Flavonoid: 2 ml ekstrak dan 1 ml etanol 96% dalam tube ditambahkan 0,1 g magnesium dan 10 tetes AlCl₃. Warna berubah menjadi kuning (Sari et al., 2022).

- d) Uji Saponin: 2 ml ekstrak ditambahkan dengan 10 ml air sambil di kocok selama 1 menit. Bila busa yang terbentuk tetap stabil selama kurang lebih 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin (Mondong et al., 2015).

2.3.3 Penentuan kandungan flavonoid total

Pembuatan kurva baku kuersetin

Kurva standar kuersetin dibuat dengan melarutkan 10 mg kuersetin dalam 100 ml etanol 96% (larutan induk kuersetin 100 ppm). selanjutnya diencerkan menjadi 50 ppm, 24 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm dengan cara diambil masing-masing 5 mL; 2,4 mL; 2 mL; 1 mL; 0,9 mL; 0,8 mL; 0,7 mL; 0,6 mL; 0,5 mL; 0,4 mL; 0,3 mL dan 0,2 mL dari larutan induk 100 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Labu ukur kemudian dicukupkan dengan etanol 96% sampai tanda batas. 1 mL larutan dari setiap konsentrasi digabungkan dengan satu mililiter AICI₃ dan 1 mL asam asetat 5%. Campuran tersebut kemudian dibiarkan tanpa gangguan selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang spesifik 230 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Selanjutnya ditetapkan persamaan Regresi Linier Kurva Baku ($y=bx + a$)

Preparasi Sampel

Ekstrak dan fraksi *Sesewanuwa* masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 ml etanol 96%. Diambil 5 mL dari larutan tersebut kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, dicukupkan etanol 96% sampai tanda batas (Larutan sampel siap digunakan). 1 mL masing-masing larutan sampel ditambahkan 1 ml AICI₃ dan 1 ml asam asetat 5%. Campuran tersebut kemudian dibiarkan tidak terganggu selama 30 menit sebelum mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 230 nm. absorbansi masing-masing sampel ditetapkan kadar dalam satuan bpj nya dengan mensubstitusikan ke nilai Y pada persamaan regresi linier $y=bx + a$. Selanjutnya konsentrasi bpj masing-masing sampel ditetapkan kadar Kuersetinnya dalam satuan mg QE/g dengan menggunakan persamaan

$$\text{Kadar Flavonoid Total} = \frac{C \times \text{Faktor pengenceran} \times \text{Volume}}{\text{Berat Sampel}} \quad (3)$$

2.3.4 Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Sebanyak 1 mL ekstrak dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/L masing-masing ditambahkan 1 mL larutan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) 90 μ M dalam etanol dan divorteks selama 2 menit. Berubahnya warna larutan dari ungu ke kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Selanjutnya pada 5 menit terakhir menjelang 30 menit inkubasi, absorbansi diukur pada λ 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Aktivitas penangkal radikal bebas dihitung sebagai presentase berkurangnya warna DPPH menggunakan persamaan

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (4)$$

2.3.5 Penentuan nilai IC₅₀

Hasil perhitungan dari aktivitas antioksidan dimasukkan ke dalam persamaan garis $y = ax + b$ dengan konsentrasi (mg/L) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % aktivitas antioksidan sebagai ordinatnya (sumbu y). Nilai IC₅₀ dari perhitungan pada saat % aktivitas antioksidan sebesar 50% akan diperoleh dari persamaan garis (Huliselan et al., 2015).

2.3.6 Uji *in vitro* antikoagulan

2.3.6.1 Penyiapan sampel uji darah

Pada penelitian ini, digunakan probandus sehat yang diambil darahnya dari ven a kubiti menggunakan alat suntik disposable 5 mL. Jumlah darah yang diambil pada tiap probandus sebanyak 3 mL. Kriteria Inklusi probandus adalah berumur dibawah 25 tahun, sehat, memiliki tekanan darah dan gula darah normal, bersedia diambil darahnya dan Hb normal. Sedangkan kriteria ekklusi probandus adalah sedang menjalani terapi obat antikoagulan, mengalami anafilaktik syok saat pengambilan darah dan sedang haid.

2.3.6.2 Prosedur uji antikoagulasi metode *Lee-White*

Disiapkan 6 tabung *vaculab plain* 3 mL yang diisi masing-masing 1 mL darah, setiap tabung ditambahkan sampel HEFS1 (F1), HEFS2 (F2), HEFS3 (F3), TEFS1 (F4) TEFS2 (F5), TEFS3 (F6), TEFS4 (F7), MEFS1 (F8), MEFS1 (F9), MEFS1 (F10), F11 EES, kuersetin dengan konsentrasi masing-masing 5% b/v, HEP 100 IU, dan Akuades dipipet 100 uL. Stopwatch dijalankan untuk menentukan waktu pembekuan darah (Rahmawati Rahmawati et al., 2018).

2.3.6.3 Prosedur uji metode apusan darah

Disiapkan 15 buah *object glass* yang bersih dan tidak berlemak dan masing-masing diberi label a-o. Dipipet darah pada masing-masing tabung reaksi sebanyak 20 µl dan ditotolkan sampel HEFS1 (F1), HEFS2 (F2), HEFS3 (F3), TEFS1 (F4) TEFS2 (F5), TEFS3 (F6), TEFS4 (F7), MEFS1 (F8), MEFS1 (F9), MEFS1 (F10), F11 EES, dan kuersetin dengan konsetrasi masing-masing 5%, HEP 100 IU, dan akuades pada 13 buah *object glass* secara berurutan. Tetesan darah pada *object glass* disentuh dengan *deck glass* dengan posisi miring, kemudian digeser ke arah berlawanan. Preparat difiksasi dalam larutan metanol sampai menutupi bagian permukaannya selama 15 menit dan diangin-anginkan sampai kering. Preparat kemudian direndam dalam larutan giemsa selama 30 menit dan dibilas dengan air, selanjutnya diangin-anginkan sampai mengering. Preparat ditetesi dengan minyak imersi dan ditutup menggunakan *deck glass*. Hasilnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan didokumentasikan dengan kamera (Rahmawati Rahmawati et al., 2018).

2.3.6.4 Pengukuran *Prothrombin Time (PT)*, *activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)*, *International Normalized Ratio (PT)*, dan *International Normalized Ratio (aPTT)*

Pengukuran PT untuk menilai jalur koagulasi ekstrinsik. Sementara itu, tes aPTT untuk menilai jalur intrinsik. Waktu trombin diukur untuk fase terakhir koagulasi. Digunakan alat *Coagulation analyzer* (Coatron M2, Teco) untuk melakukan percobaan. Penelitian ini menggunakan heparin (12,4 UI/ml) sebagai kontrol positif dan larutan garam sebagai kontrol negatif. Kit reagen TEClot PT-S (TECO) digunakan untuk pengukuran PT, sementara itu, TEClot aPTT-S dan kalsium klorida 0,025 M untuk aPTT. Selain itu, senyawa standar kuersetin digunakan sebagai pembanding dengan konsentrasi 10 mg/ml. Ekstrak dan fraksi dibuat dalam konsentrasi 50 mg/mL.

Sebanyak 100 μ l plasma dicampur dengan 100 μ l larutan uji dan diaduk secara perlahan. Tambahkan 50 μ l dari 3,2% plasma sitrat. Inkubasi selama 2 dan 3 menit untuk PT dan aPTT. Tambahkan 100 μ l reagen PT, 50 μ l reagen dan 50 μ l reagen CaCl₂. Lakukan pemanasan awal dan lihat PT, aPTT, INR PT, dan INR aPTT. Hasil uji koagulasi dilaporkan sebagai nilai median dengan kisaran minimum dan maksimum, diberikan dalam satuan detik (Torres-Urrutia et al., 2011).

2.3.7 Karakterisasi fraksi

2.3.7.1 Penentuan serapan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotomer UV-Vis

Sampel fraksi dilarutkan dengan metanol dan dibuat konsentrasi 80 bpj. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet dan ditentukan panjang gelombang maksimum. Hal yang sama dilakukan pada baku hispidulin.

2.3.7.2 Penentuan gugus fungsi dengan spektroskopi FTIR

Fraksi sebanyak 10 mg digerus bersama-sama dengan kalium bromida (KBr), kemudian ditekan hingga membentuk pelet. Setelah itu, pelet dimasukkan ke dalam alat *Fourier Transform Infra Red*, selanjutnya dilakukan proses *running* (Kwame Adosraku et al., 2013; Saha et al., 2013).

2.3.7.3 Penentuan serapan dengan UFLC

Ultra Fast Liquid Chromagrophy (UFLC) adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan berbagai konstituen senyawa. Ini adalah teknik yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi, mengukur, dan memisahkan komponen campuran. Ini menggunakan tekanan tinggi untuk mendorong pelarut melalui kolom. Karakterisasi fraksi *Sesewanua* terpilih menggunakan UFLC Merk Shimadzu di Laboratorium Biofarmaka, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar. Pemisahan RP-UFLC dioptimalkan dengan elusi isokratik seluler fase gerak (air: asetonitril-40: 60%, v/v) menggunakan kolom Simetri C18 (4,6 \times 250 mm, 5 μ m) pada suhu 30°C dengan laju alir 1,0 mL/menit. Sebelum digunakan, fraksi *Sesewanua* terpilih dilarutkan kembali dengan metanol melalui sonikator selama 15 menit dan

disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit untuk membuat sampel konsentrasi 10 mg / mL. Sampel dan pelarut yang digunakan untuk fase gerak disaring melalui alat penyaringan pelarut (Millipore, USA) menggunakan membran nilon 0,45 μm . Panjang gelombang detektor disesuaikan pada 254 nm, dan volume injeksi adalah 10 μL (Hasan et al., 2023; Srivastava et al., 2021).

2.3.7.3 Difraksi XRD

Pemeriksaan difraksi sinar-X (XRD) dilakukan menggunakan instrumen XRD Rigaku MiniFlex II. Teknik difraksi sinar-X (XRD) digunakan untuk membuat ulang pola XRD serbuk yang dihasilkan dari setiap sampel. Pengaturan eksperimental terdiri dari logam target tembaga, filter kalium (K^3), tegangan 40 kilovolt (kV), dan arus radiasi 30 miliampere (mA). Kemudian, radiasi dideteksi di wilayah kristal spesimen menggunakan goniometer vertikal. Pola-pola tersebut diperoleh pada suhu sekitar menggunakan lebar panggung 0,04°C dan resolusi detektor 2° (sudut difraksi) dalam kisaran 10° hingga 80° (Aisyah et al., 2024).

2.3.7.4 Penentuan kadar senyawa hispidulin dalam fraksi

2.3.7.4.1 Pembuatan larutan stok

Baku Hispidulin dibuat dalam konsentrasi 1.000 bpj dengan cara melarutkan 2 mg Hispidulin kedalam 2 mL pelarut metanol.

2.3.7.4.2 Penentuan panjang gelombang maksimum senyawa hispidulin dalam pelarut metanol

Konsentrasi Baku Hispidulin 1.000 bpj selanjutnya diencerkan menjadi 300 bpj dengan cara, mengambil 600 μl diencerkan dengan metanol hingga 2 ml. selanjutnya baku Hispidulin konsentrasi 300 bpj dimasukkan kedalam Spektro UV VIS dan dilakukan penetapan karakteristik profil scan lamda senyawa baku hispidulin menggunakan spektrofotometri UV VIS pada panjang gelombang yang telah diatur dari 200 nm sampai dengan 400 nm.

2.3.7.4.3 Pembuatan kurva baku hispidulin dalam pelarut metanol

Dibuat kurva baku dengan mengambil berturut-turut dari dari 300 bpj secara bertingkat berturut-turut 500, 500, 500, 500, 500 μl dan diencerkan dengan 500, 500, 500, 500 500 μl metanol sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 150, 75, 37,5, 18,75, dan 9,375 bpj. Diukur serapannya pada panjang gelombang 248 nm.

2.3.7.4.4 Pengukuran kadar hispidulin dalam TEFS1

Ditimbang 10mg TEFS1 dan dilarutkan dalam 10 ml metanol sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1.000 bpj. Dipipet sebanyak 1.000, 600, 750 μl dan ditambahkan metanol sebanyak 1.000, 1400, dan 750 μl sehingga didapatkan larutan TEFS1 konsentrasi 75 bpj. Diukur serapannya pada panjang gelombang 248 nm.

2.3.7 Studi in silico network pharmacology

2.3.7.1 Identifikasi protein terkait trombosis

Protein terkait trombosis diambil dari beberapa database online, seperti database *GeneCards* (<https://www.genecards.org/>), database OMIM (<https://www.omim.org/>), dan *DisGeNET* (<http://www.disgenet.org/>) dengan kata kunci "thrombosis". Pada *DisGeNET*, protein target dipilih berdasarkan *cut off* "score_gda > 0.1, sedangkan untuk *GeneCards*, digunakan skor >1.

2.3.7.2 Prediksi target senyawa *Sesewanua* dan analisis irisan protein

Berdasarkan hasil analisis, analisis in silico ini difokuskan pada tiga senyawa utama yang teridentifikasi pada fraksi *Sesewanua*, yaitu hispidulin, verbascoside, dan isoverbascoside. Protein target dari senyawa *Sesewanua* dianalisis menggunakan dua basis data online integratif seperti *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch>) dan *PharmMapper*. Analisis dilakukan menggunakan data SDF atau SMILES dari struktur senyawa bioaktif *Sesewanua* yang diperoleh dari database *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pada *SwissTarget Prediction*, kami menelusuri protein target menggunakan spesies *Homo Sapiens* dan dengan nilai probabilitas >0. Sementara itu, *PharmMapper* dijalankan dengan pengaturan *Maximum Generated Conformations* 300, *Human Protein Targets Only*. Dalam riset ini, kami hanya mengambil target dengan nilai lebih dari nol untuk dianalisis lebih lanjut di database *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) untuk mendapatkan simbol protein target.

Protein yang diperoleh dari setiap database digabungkan dan selanjutnya menghilangkan protein duplikat. Protein yang diperoleh dari identifikasi protein terkait trombosis dan Target Senyawa *Sesewanua* selanjutnya dianalisis menggunakan Diagram Venn (<https://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/example.html>) untuk mengidentifikasi protein yang tumpang tindih untuk memperoleh data protein terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa *Sesewanua*.

2.3.7.3 Analisis *protein-protein interaction* (PPI) network dan topologinya

Target protein yang tumpang tindih divisualisasikan untuk mendapatkan *protein-protein interaction* (*PPI network*) menggunakan database STRING 12.0 (<https://string-db.org/>) dengan batasan spesies "*homo sapiens*", nilai confidence $\geq 0,4$, FDR stringency medium (5 persen). Data interaksi protein yang diperoleh dianalisis lebih lanjut menggunakan Cytoscape 3.10.1 (<https://cytoscape.org/>) untuk membangun jaringan PPI. Analisis topologi dilakukan dengan menyaring berdasarkan rentang nilai derajat, keterkaitan dan kedekatan sentralitas.

2.3.7.4 Konstruksi *compound-target* (CT) network dan identifikasi protein hub

CT dipelajari untuk menganalisis dan memvisualisasikan bagaimana senyawa *Sesewanua* dapat berinteraksi dengan protein target fungsional utama trombosis. Pertama, jaringan protein kluster fungsional utama ditentukan menggunakan plugin

MCODE dari *Cytoscape* dan protein yang berinteraksi paling tinggi dipilih berdasarkan skor MCODE yang lebih tinggi. Selanjutnya, jaringan CT dibangun menggunakan protein dalam kluster terbaik dan senyawa *Sesewanua*. Di sisi lain, Hub-protein dibangun menggunakan *plugin cytoHubba* dari *Cytoscape*. Protein dari kluster terbaik selanjutnya digunakan untuk identifikasi protein hub. Dalam analisis ini, kami menggunakan beberapa parameter yang berbeda termasuk derajat, keterkaitan, kedekatan dan MNC untuk mengidentifikasi 10 gen hub teratas dan 5 target potensial.

2.3.7.5 Analisis gene ontology dan KEGG pathway

Analisis *Gene Ontology* dan *KEGG pathway* dilakukan untuk mengeksplorasi mekanisme utama dari senyawa-senyawa yang ada dalam pengobatan trombosis. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan alat berbasis online, ShinyGO versi 0.8 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) untuk mendapatkan informasi mengenai proses biologis (BP), komponen seluler (CC), fungsi molekuler (MF) dan jalur yang diperkaya (KEGG). Simbol protein kluster fungsional utama yang ditargetkan oleh *Sesewanua* dimasukkan ke dalam perangkat dan selanjutnya ditetapkan untuk membatasi spesies dalam *Homo sapiens* dengan cut-off FDR sebesar 0,01.

2.3.7.6 Konstruksi jaringan compound-target-pathway (CTP)

Konstruksi CTP dibuat menggunakan perangkat lunak *Cytoscape* dengan mengintegrasikan senyawa *Sesewanua*, gen target, dan jalur inti terkait trombosis yang diidentifikasi oleh pengayaan KEGG. Gen target diambil dari analisis kluster terbaik menggunakan modul MCODE.

2.3.7.7 Verifikasi pengikatan senyawa ke protein dengan molecular docking

Molecular docking dilakukan untuk memverifikasi interaksi molekuler dan pengikatan senyawa dengan sebagian besar protein yang terkait dengan trombosis. Analisis ini dilakukan untuk menentukan kemampuan senyawa untuk berikatan dengan situs pengikatan reseptor yang dinilai dengan menggunakan paket program *AutoDock Vina*. Ketiga senyawa yang diperoleh dari database *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam bentuk .sdf akan didocking terhadap lima protein target. Sebelum dilakukan penambatan, senyawa .sdf diubah ke dalam format .pdb menggunakan *MarvinView* kemudian diubah ke dalam format .pdbqt menggunakan *Autodock* setelah dilakukan perhitungan muatan dan hidrogen polar. Selanjutnya, persiapan protein target dimulai dengan mengunduh struktur triad protein AKT1, CASP3, ALB dan MMP9 dari RCSB PDB dengan ID 3O96, 1NME, 2BXF, dan 1GKC. Persiapan reseptor juga dilakukan dengan menggunakan *Autodock* dengan hidrogen polar dan muatan yang ditambahkan ke reseptor.

2.3.6.8 Simulasi dinamika molekuler dan analisis

Dinamika molekuler protein dengan ligan dilakukan pada protein dan ligan yang memiliki hasil *docking* terbaik. Analisis ini diselesaikan menggunakan *OpenMM* dan *AMBER force fields* yang dijalankan di *Google collabs*. Suhu diatur konstan pada 310 K. Kompleks ini di solvasi dengan model air ff19SB dalam box 12x12x12 dengan

penambahan NaCl 0.15 sebagai penetralisir. Simulasi dilakukan pada *time step* 10 ns. Kami juga menggunakan metode *molecular mechanics generalized born surface area* untuk mengukur afinitas dalam bentuk energi ikat bebas senyawa *Sesewanua* dalam berikatan dengan protein terpilih. Nilai yang lebih kecil menunjukkan kemampuan yang lebih besar untuk berikatan.

2.3.8 Analisis Statistik

Hasil penelitian dilaporkan sebagai nilai rata-rata \pm standar deviasi (SD) dan disusun menggunakan Microsoft Excel 2016 (Seattle, WA, USA). Data FTIR dan XRD dianalisis dengan perangkat lunak Origin Pro 8 yang disediakan oleh OriginLab, yang berlokasi di Northampton, MA, AS. Studi statistik dilakukan dengan menggunakan IBM SPSS. Data dikonversi ke dalam format grafis menggunakan GraphPad Prism versi 9. Hasil dinyatakan signifikan bila nilai $p < 0.05$. menggunakan analisis statistik Kruskal Wallis dan ANOVA.

2.4 Hasil dan Pembahasan

2.4.1 Ekstraksi dan fraksinasi

2.4.1.1 Kadar air simplisia daun *Sesewanua*

Kadar air merupakan salah satu faktor yang berpengaruh besar terhadap daya tahan bahan olahan. Semakin rendah kadar air, maka pertumbuhan organisme akan semakin lambat dan bahan pangan akan lebih awet. Sebaliknya, semakin tinggi kadar air, semakin cepat organisme berkembang biak, sehingga proses pembusukan berlangsung dengan cepat. Hasil penentuan kadar air simplisia dari penelitian ini adalah 9,18%. Berdasarkan data di atas, simplisia dari daun *Sesewanua* (SS) termasuk ke dalam simplisia yang baik yaitu memiliki kadar air kurang dari 10% (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Tingkat kelembaban yang rendah pada bahan tanaman dapat mengurangi pertumbuhan jamur dan menjaga simplisia tetap awet (Mentari et al., 2020).

2.4.1.2 Rendemen ekstrak etanol daun *Sesewanua*

Metode maserasi dipilih untuk penelitian ini karena metode ini merupakan metode yang paling mudah dan tidak rumit. Maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut untuk menarik semua komponen kimia karena etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik bahan kimia yang dapat larut dari cairan non polar ke polar (Sari et al., 2022).

Rendemen merupakan berat total dari seluruh senyawa metabolit sekunder yang dapat diekstrak dari suatu sampel atau tanaman. Perhitungan rendemen ekstrak dilakukan untuk mengetahui jumlah senyawa bioaktif dalam bahan yang diekstrak. Nilai rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung dalam tanaman. Rendemen ekstrak etanol *Sesewanua* (EES) yang diperoleh dari proses maserasi sebesar 119,81 g atau 11,98%.

Rendemen ekstrak kental daun *Sesewanua* memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia (2017), yang menyatakan bahwa syarat rendemen ekstrak yang baik adalah $>10\%$ (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Hal ini berarti etanol 96% diyakini

dapat mengekstrak senyawa polar dan non polar dari *Simplisia Sesewanua*. Hal ini sejalan dengan penelitian Rahmadani, et al. 2018 yang menemukan bahwa etanol 96% mengekstrak kadar gingerol dan shogaol tertinggi dibandingkan dengan etanol 70% dan 30% pada ekstraksi jahe merah dan Indaswati, 2018 yang menemukan bahwa etanol 96% paling efektif untuk mengekstraksi flavonoid dari daun dewandaru (Arista Indraswari, 2008; Rahmadani et al., 2018)

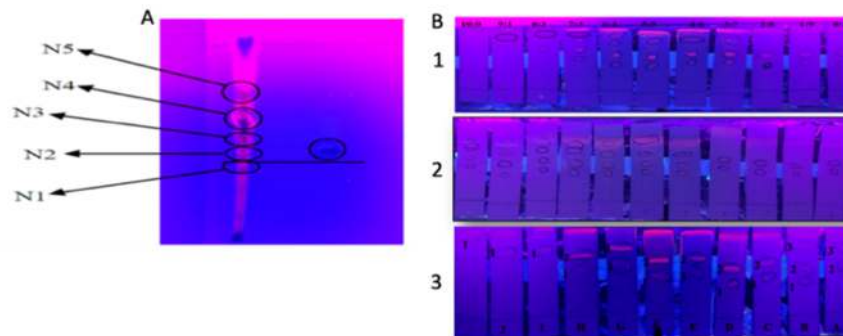
2.4.1.3 Rendemen fraksi daun *Sesewanua*

Rendemen fraksi daun *Sesewanua* didapatkan dari hasil kromatografi kolom untuk masing-masing campuran eluen. Rendemen HEFS1, HEFS2, HEFS3, TEFS1, TEFS2, TEFS3, TEFS4, MEFS1, MEFS2, MEFS3 adalah 55,96%, 50,42%, 54,53%, 49,00%, 46,04%, 48,43%, 49,75%, 43,23%, 42,07%, 45,24%. Seluruh rendemen fraksi di atas 10%. Hal ini mengindikasikan bahwa proses fraksinasi mampu memisahkan senyawa sekunder dari ekstrak berdasarkan kepolarannya. Hal ini sesuai dengan temuan dari Fernanda, et.al, 2021 bahwa fraksinasi menggunakan metode kromatografi dapat memisahkan senyawa sekunder ekstrak daun *Mitragyna Speciosa* (Hanny Ferry Fernanda et al., 2021).

2.4.1.4 Profil KLT

KLT adalah cara untuk memisahkan senyawa kimia berdasarkan seberapa cepat atau seberapa merata kedua bagian campuran bergerak melaluinya. Bagian-bagian ini disebut fase diam dan fase gerak. Nilai Rf dapat digunakan sebagai acuan untuk identifikasi senyawa dan menunjukkan perbedaan sifat molekul senyawa tersebut. Senyawa yang memiliki Rf yang lebih tinggi memiliki kepolaran yang lebih rendah, dan sebaliknya. Hal ini karena fase diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan dengan kuat pada fase diam, sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah.

Gambar 2.1 A, menunjukkan hasil uji KLT awal ekstrak daun *Sesewanua* dielusi dengan kloroform, aseton, asam format (10:2:1) dan silika gel 60 sebagai fase diam. Lima bercak diperoleh dengan nilai Rf (faktor retardasi) masing-masing 0,375 senyawa terpenoid, 0,475, 0,525 senyawa rutin, dan 0,6 dan 0,75 senyawa alkaloid yang dideteksi di bawah sinar UV pada 366 nm, dan kuersetin (QE) sebagai standar pembanding untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid. Kuersetin adalah senyawa flavonoid utama yang termasuk dalam kelompok flavonol yang digunakan sebagai pembanding. Munculnya noda pada kedua ekstrak daun *Sesewanua* menunjukkan bahwa noda tersebut sejajar dengan QE dan memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,475 yang diidentifikasi sebagai senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki nilai Rf 0,475. Dilihat dari tingkat kelarutannya senyawa flavonoid larut dalam pelarut non polar dan polar, pelarut polar yang umum digunakan adalah etanol, metanol, dan aseton.



Gambar 2.1. Profil KLT A. EES, B. fraksi 1) HEFS, 2) TEFS, 3) MEFS

Analisis KLT dilakukan untuk mengetahui jumlah fraksi komponen senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak. Hasil fraksi dengan eluen kloroform, aseton dan asam format dengan perbandingan 10:2:1 dapat dilihat pada Gambar 2.1 dan Tabel 2.1.

Gambar 2.1.B. menunjukkan hasil uji KLT fraksi ekstrak daun *Sesewanua* menggunakan 3 campuran eluen berbeda disandingkan dengan etil asetat yakni N-Heksan : etil Asetat , Toluena ; etil asetat dan Metanol : etil Asetat dengan masing-masing perbandingan campuran eluen 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10. Metode fraksinasi merupakan metode pemisahan menggunakan eluen yang ditingkatkan kepolarannya.

n-Hexan: Ethanol Fraction of Sesewanua (HEFS) pada Gambar 2.1.B.1 dan Tabel 2.1 menunjukkan hasil profil KLT dan nilai Rf HEFS campuran eluen 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10. Kemudian, dikelompokkan menjadi 3 campuran Fraksi utama berdasarkan kesamaan nilai Rf yang diperoleh. HEFS1 merupakan fraksi dengan campuran eluen (10:0, 9:1, 8:2, 7:3 dan 6:4) memiliki nilai Rf 0,4 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 dan 0,7 senyawa alkaloid, Rf 0,8 dan 0,9 senyawa tanin. HEFS2 merupakan fraksi dengan campuran eluen (5:5, 4:6, 3:7) memiliki nilai Rf 0,4 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 senyawa alkaloid, dan Rf 0,8 senyawa tanin. HEFS3 merupakan fraksi dengan campuran eluen (2:8, 1:9, 0:10,) memiliki nilai Rf 0.4 senyawa kuersetin dan Rf 0,6 senyawa alkaloid.

Toluen: Ethanol Extract of Sesewanua (TEFS) pada Gambar 2.1.B.1 dan Tabel 2.1 menunjukkan hasil profil KLT dan nilai Rf Fraksi Toluena : Etil Asetat campuran eluen 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10. Yang dikelompokkan menjadi 4 campuran Fraksi utama berdasarkan kesamaan nilai Rf yang diperoleh. TEFS1 merupakan fraksi dengan campuran eluen (10:0, 9:1) memiliki nilai Rf 0,4 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 dan 0,7 senyawa alkaloid, Rf 0,8 dan 0,9 senyawa tanin. TEFS2 merupakan fraksi dengan campuran eluen (8:2, 7:3, 6:4, 5:5) memiliki nilai Rf 0.4 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 dan 0,7 senyawa alkaloid, Rf 0,8 dan 0,9 senyawa tanin. TEFS3 merupakan fraksi dengan campuran eluen (4:6, 3:7) memiliki nilai Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 dan 0,7 senyawa

alkaloid, Rf 0,8 senyawa tanin. TEFS4 merupakan fraksi dengan campuran eluen (2:8, 1:9, 0:10) memiliki nilai Rf 0.4 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 senyawa alkaloid.

Methanol: Ethanol Extract of Sesewanua (MEFS) pada gambar Gambar 2.1.B.1 dan Tabel 2.1 menunjukkan hasil profil KLT dan nilai Rf M campuran eluen 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10. Yang dikelompokkan menjadi 3 campuran Fraksi utama berdasarkan kesamaan nilai Rf yang diperoleh. MEFS1 merupakan fraksi dengan campuran eluen (10:0, 9:1, 8:2) memiliki nilai Rf 0,7 senyawa alkaloid dan Rf 0,8 senyawa tanin. TEFS2 merupakan fraksi campuran eluen (7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8) memiliki nilai Rf 0,3 dan 0.4 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin, Rf 0,6 dan 0,7 senyawa alkaloid. MEFS3 merupakan fraksi dengan campuran eluen (1:9, 0:10) memiliki nilai Rf 0.3 senyawa kuersetin, Rf 0,5 senyawa rutin dan Rf 0,6 dan 0,7 senyawa alkaloid serta Rf 0,8 senyawa tanin.

Tabel 2.1. Nilai Rf noda fraksi *Sesewanua*

	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10	
			HEFS1				HEFS2			HEFS3		
5		0,9 (5)	0,925 (5)	0,95 (5)	0,925 (4)							
4			0,675 (4)	0,875 (4)	0,8 (3)	0,85 (3)	0,875 (3)	0,875 (3)				
3				0,7 (3)	0,6 (2)	0,6 (2)	0,625 (2)	0,65 (2)	0,6 (1)	0,6 (1)	0,625 (1)	
2				0,55 (2)	0,425 (1)	0,425 (1)	0,475 (1)	0,525 (1)	0,4 (1)	0,425 (1)	0,45 (1)	
	TEFS1		TEFS2			TEFS3			TEFS4			
5	0,925	0,975										
4	0,875	0,875	0,925	0,9	0,85	0,975						
3	0,775	0,775	0,8	0,8	0,75	0,75	0,75	0,82				
2	0,65	0,625	0,625	0,6	0,575	0,6	0,6	0,7	0,65	0,575	0,65	
1	0,5	0,45	0,475	0,45	0,425	0,475	0,5	0,55	0,5	0,425	0,5	
	MEFS1			MEFS2				MEFS3				
3										0,8	0,75	
2				0,75	0,75	0,625	0,675	0,575	0,625	0,625	0,55	
1	0,875	0,775	0,75	0,525	0,55	0,45	0,5	0,375	0,45	0,375		

2.4.2 Skrining simplisia, ekstrak dan fraksi daun *Sesewanua*

2.4.2.1 Skrining fitokimia simplisia, ekstrak, dan fraksi daun *Sesewanua*

Skrining fitokimia merupakan langkah awal untuk mengetahui jenis-jenis senyawa yang terdapat dalam suatu bahan alam (Sa'adah & Nurhasnawati, 2015). Hasil skrining fitokimia simplisia dan ekstrak daun *Sesewanua* dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini yaitu daun *Sesewanua* mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin tetapi tidak mengandung saponin.

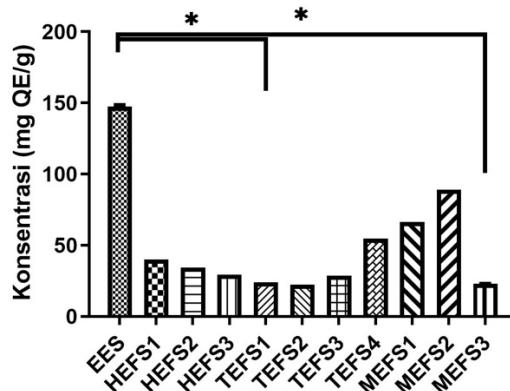
Tabel 2.2. Skrining fitokimia simplisia, ekstrak, dan fraksi daun *Sesewanua*

Jenis Uji	SS	EES	HEFS			TEFS				MEFS			Parameter	
			1	2	3	1	2	3	4	1	2	3		
Alkaloids														
a. Mayer's reagent	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Endapan putih
b. Dragendorff's reagent	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Endapan oranye sampai merah coklat
Flavonoid														
Mg + AlCl ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Kuning atau oranye
Tanin														
FeCl ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Hijau tua
Saponin														
Air panas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Busa yang bertahan 10 menit

2.4.2.2 Flavonoid total

Pengukuran nilai flavonoid total menggunakan kuersetin sebagai baku standar merupakan cara yang umum digunakan untuk memprediksi jumlah flavonoid dalam sampel yang memiliki kesamaan struktur dengan kuersetin.

Berdasarkan gambar 2.3, nilai flavonoid total dari EES 147,45±1,00 mg QE/g dan fraksi *Sesewanua* bervariasi dari 22,35±0,01 – 89,11±0,03 mg QE/g. EES merupakan yang tertinggi di antara semua jenis fraksi. Hal ini dapat dijelaskan bahwa ekstrak masih mengandung komponen bahan aktif yang lengkap dibandingkan dengan fraksi. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa flavonoid EES berbeda nyata dengan HEFS3, TEFS1, TEFS2, TEFS3 dan MEFS3 ($p < 0,05$), namun tidak berbeda nyata dengan HEFS1, HEFS2, TEFS4, MEFS1, dan MEFS2 ($p > 0,05$).



Gambar 2.2. Flavonoid total ekstrak dan fraksi *Sesewanua* (rata-rata \pm SD, n=3)

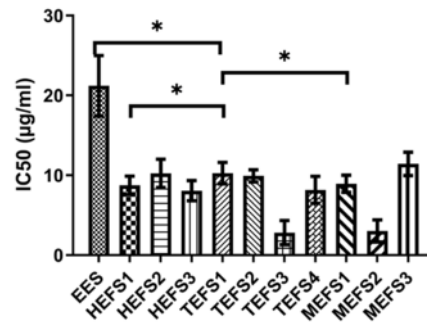
2.4.2.3 Aktivitas antioksidan fraksi *Sesewanua*

Uji antioksidan suatu senyawa atau ekstrak umumnya menggunakan 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) sebagai sumber radikal bebas. Hal ini dikarenakan metode DPPH merupakan metode pengujian antioksidan yang sederhana, cepat, dan tidak memerlukan banyak reagen. DPPH adalah radikal pengoksidasi yang tersedia secara komersial yang digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan baik antioksidan alami maupun sintetis. Selama pengujian ini, senyawa DPPH mengalami proses reduksi, sehingga terjadi perubahan dari warna ungu menjadi warna kuning pucat. Perubahan ini terjadi akibat molekul antioksidan menyerap atom hidrogen. Semakin tinggi konsentrasi antioksidan dalam ekstrak, maka semakin besar pula reduksi DPPH yang terjadi, sehingga intensitas warna kuning semakin meningkat (Muthukumarasamy et al., 2018). Nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang menghentikan aktivitas DPPH menjadi setengahnya, dapat digunakan untuk mengetahui arti dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. (Setiawan et al., 2018).

Dari tabel 3 dan gambar 2.2, EES dan fraksi memiliki IC_{50} pada kisaran 2,56-20,89 μ g/ml. Ekstrak dan fraksi memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, dengan nilai IC_{50} <50 μ g/ml. Kami menduga, senyawa yang bertanggung jawab sebagai antioksidan pada daun *Sesewanua* adalah flavonoid (Huliselan et al., 2015).

Flavonoid sangat baik dalam menyingkirkan spesies reaktif seperti superoksida, radikal peroksil, dan peroksinitrit dengan memindahkan atom hidrogen. Flavonoid menghentikan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan beberapa cara, seperti dengan menghambat enzim *xantin oksidase* dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADPH) *oksidase* dan dengan mengkelat logam (Fe^{2+} dan Cu^{2+}) untuk menghentikan reaksi redoks yang membentuk radikal bebas. Semua fraksi menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0,05$) dalam nilai IC_{50} dibandingkan dengan ekstrak. Hal ini menandakan bahwa fraksinasi meningkatkan aktivitas antioksidan (Runtuwene et al., 2019; Setiawan et al., 2018).

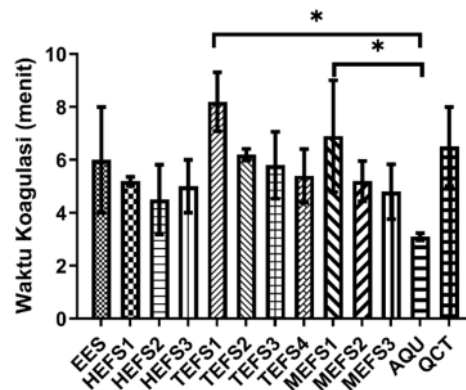
Nur, e.al. 2019 menyimpulkan bahwa terdapat korelasi yang sedang antara kadar total flavonoid dari ekstrak dan fraksi daun jati putih (*Gmelina arboria* Roxb) terhadap aktivitas dalam meredam radikal DPPH (Nur et al., 2019).



Gambar 2.3. Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi menggunakan DPPH (rata-rata \pm SD, n=3)

2.4.2.4 Waktu pembekuan

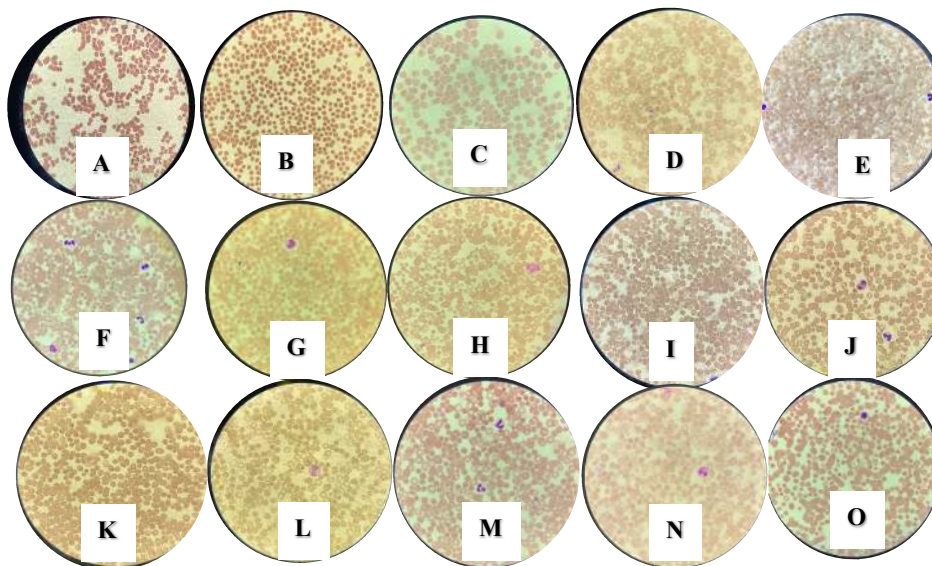
Berdasarkan waktu koagulasi darah lengkap, EES dan semua fraksi dapat memperpanjang waktu koagulasi darah ($4,50 \pm 1,32$ – $8,17 \pm 1,17$ menit) jika dibandingkan dengan AQU ($3,08 \pm 0,14$ menit) sebagai kontrol negatif. EES, QCT, HEFS1, TEFS1, TEFS2, TEFS3, TEFS4, MEFS1, MEFS2 dan MEFS3 memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dengan akuades. Hal ini senada dengan penelitian Rahmawati, 2018 dan Nurhayati, 2018 yang mendapatkan perlambatan koagulasi darah pada pemberian sari bawang putih dan ekstrak kulit jeruk bali (Nurhayati et al., 2018; Rahmawati, 2018).



Gambar 2.4. Waktu koagulasi *in vitro* 50 mg/mL ekstrak dan fraksi daun *Sesewanua* dibandingkan dengan negatif (akuades, AQU) dan kuersetin positif, QCT (rata-rata \pm SD, n=3)

2.4.2.5 Tes apusan darah

Pada tes apusan darah, sel darah merah yang tidak mengalami koagulasi berbentuk bulat, tidak saling berkaitan dan berdiri sendiri dengan ukuran yang sama satu sama lain. Berdasarkan gambar 2.5, Apusan darah mikroskopis, EES (e), HEFS1(f), HEFS2 (g), HEFS3 (h), TEFS1 (i), TEFS2 (j), dan MEFS1 (m), MEFS3 (o) menunjukkan bahwa pada menit ke-1, darah masih belum menunjukkan pembekuan jika dibandingkan dengan kontrol negatif (akuades). Hal ini senada dengan penelitian Rahmawati, 2018 yang mendapatkan perlambatan pada apusan darah yang diberikan sari bawang putih (Nurhayati et al., 2018; Rahmawati, 2018).

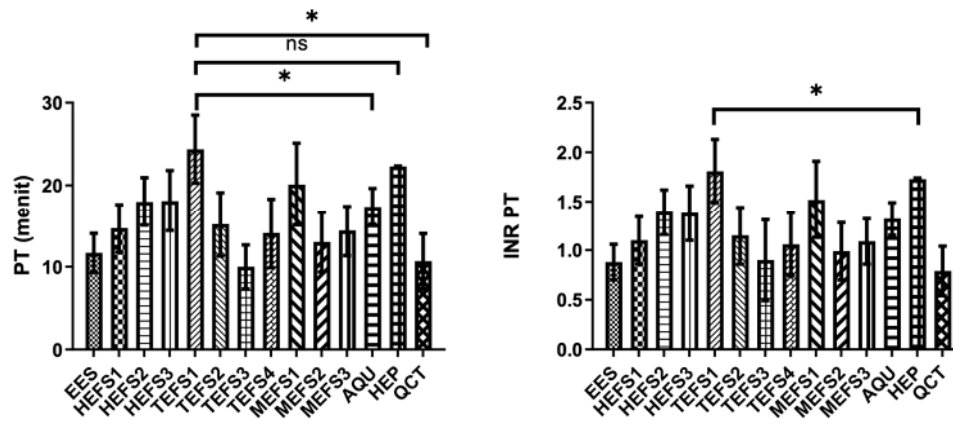


Gambar 2.5. Mikroskop apusan darah fraksi *Sesewanua*; a. kontrol negatif; b. heparin, c: EDTA; d. kuersetin; e. EES, f. HEFS1; g. HEFS2; h. HEFS3; i. TEFS1; j. TEFS2; k. TEFS3; l. TEFS4; m. MEFS1; n. MEFS2; o. MEFS3.

2.4.2.6 Waktu pembekuan secara *in vitro*

Berdasarkan gambar 2.6, QCT, EES, HEFS1, TEFS2, TEFS3, TEFS4, tidak menunjukkan adanya perlambatan nilai PT, sedangkan HEFS2 ($18,0 \pm 2,24$ s), HEFS3 ($18,1 \pm 3,70$ s), TEFS1 ($24,4 \pm 4,12$ s), dan MEFS1 ($20,1 \pm 5,01$ s) hasil PT lebih lama dibandingkan dengan kontrol negatif (kisaran 17,4 s dan 15,9-20,0 s; Tabel 6). Hal ini menunjukkan bahwa HEFS2, HEFS3, TEFS1, MEFS1 dapat menghambat pembekuan darah melalui jalur ekstrinsik (TF-FVIIa). Pemblokiran TF-FVIIa dapat memblokir aktivasi fX dan protrombin, yang mengarah pada pembuatan trombin, yang kemudian mengubah fibrinogen menjadi fibrin yang terpolimerisasi (Fischer, 2018). Berdasarkan analisa statistik, TEFS1 berbeda nyata dengan akuades dan kuersetin ($p < 0,05$), namun tidak berbeda nyata dengan heparin ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa TEFS1 potensial dalam penghambatan jalur ekstrinsik. Hasil

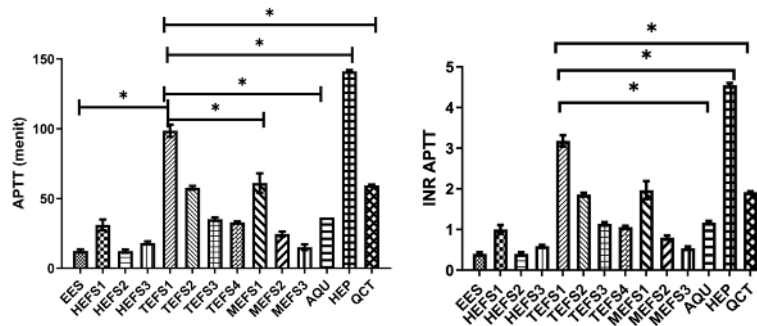
INR PT menunjukkan bahwa HEFS1, TEFS3, TEFS4, MEFS2, MEFS3 signifikan terhadap AQU. MEFS1 tidak signifikan terhadap TEFS1.



Gambar 2.6. PT dan INR PT 50 mg/mL ekstrak dan fraksi daun *Sesewanua* dibandingkan dengan negatif (AQU, akuades) dan positif kuersetin QCT dan heparin HEP (rata-rata \pm SD, $n=3$)

Sedangkan melalui jalur intrinsik (FVIIIa-FIXa), HFS1, HFS2, HFS3, TFS3, MEFS2, dan MEFS3 tidak menunjukkan aPTT yang berkepanjangan. Tetapi QCT ($59,4 \pm 0,55$ s), TEFS1 ($98,6 \pm 4,38$ s), TEFS2 ($57,7 \pm 1,30$ s), dan MEFS1 ($61,1 \pm 6,98$ s) memperpanjang aPTT dibandingkan dengan kontrol negatif ($36,5$ s dan $35,7-38,0$ s kisaran; Tabel 6) (Fischer, 2018; Torres-Urrutia et al., 2011a). Dari persamaan statistik, aPTT TEFS1 dalam kisaran yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan AQU, QUE, HEP, dan seluruh fraksi. Hal ini berarti TEFS1 sebagai fraksi yang potensial dalam penghambatan koagulasi melalui intrinsik. INR aPTT EES dan HEFS2 signifikan terhadap AQU. TEFS1 dan MEFS1 tidak signifikan.

HEFS2 dan HEFS3 memiliki efek antikoagulan melalui satu jalur ekstrinsik, TEFS2 melalui jalur intrinsik, dan TEFS1 dan MEFS1 melalui dua jalur, yaitu intrinsik dan ekstrinsik, yang mempengaruhi TF, FVIIa, FVIIIa, dan FIXa. Peningkatan nilai PT fraksi daun *Sesewanua* lebih tinggi dari temuan sebelumnya. Ekstrak dari varietas anggur Sultanina (*Vitis vinifera* L.) dengan nilai PT 12,8 detik, terong (*Solanum melongena* L.) 12,9 detik dan melon (*Cucumis melo* L.) tipe Tuna 13,0 detik (kontrol negatif 12,1-13,0 detik). Sedangkan untuk jalur intrinsik, Rasberi (*Rubus idaeus* L.) menunjukkan perlambatan aPTT 54,3 detik, Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) 44,6 detik (kontrol negatif 38 detik) (Camire, 2021; Khandker et al., 2022; Khouya et al., 2020; Rababa'h et al., 2020; Sławińska et al., 2023; Urrutia et al., 2011; Yamada et al., 2004).



Gambar 2.7. aPTT dan aPTT 50 mg/mL ekstrak dan fraksi daun Sesewnuwa dibandingkan dengan negatif (AQU, akuades) dan positif kuersetin QCT dan positif kuersetin QCT dan heparin HEP (rata-rata \pm SD, $n=3$)

TEFS1 dan MEFS1 merupakan 2 kandidat terbaik untuk fraksi antitrombosis. Berdasarkan pertimbangan pebandingan nilai, TEFS1 menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan MEFS1 pada pengujian PT, aPTT, coagulation time, INR PT, INR aPTT, serta apusan darah menunjukkan bentuk sel darah lebih bulat dan tidak bersatu dibandingkan MEFS1. Analisis statistik menunjukkan nilai aPTT yang signifikan antara TEFS1 dan MEFS1, maka disimpulkan bahwa TEFS1 merupakan fraksi terpilih yang potensial sebagai antitrombosis.

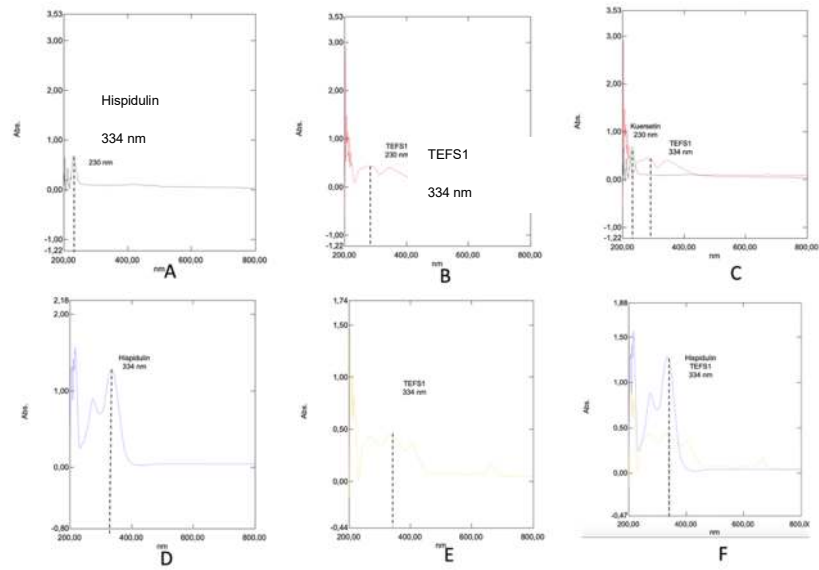
2.4.3 Karakterisasi TEFS1

2.4.3.1 Karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

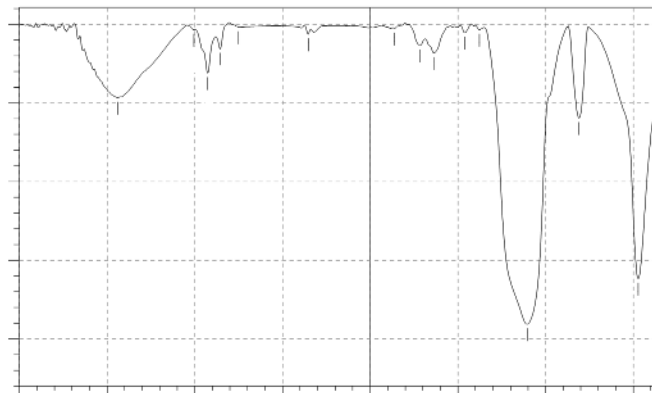
Gambar 2.8 menunjukkan hasil spektra UV-Vis TEFS1 tidak memiliki kemiripan dengan kuersetin (230 nm) namun kemiripan dengan Hispidulin karena sama-sama memiliki panjang gelombang maksimum 334 nm.

2.4.3.2 Karakterisasi menggunakan FTIR

Fourier Transform Infrared (FTIR) merupakan metode spektroskopi yang digunakan untuk mengkarakterisasi serapan fraksi. Analisis TEFS1 dilakukan pada panjang gelombang pada $500-4000\text{ cm}^{-1}$. Sampel dapat berupa molekul kompleks karena spektrum HRFS-FTIR memiliki lebih dari 5 pita serapan. Terdeteksi puncak inframerah (IR) pada bilangan gelombang $3623,19\text{ cm}^{-1}$, diikuti dengan adanya spektrum pada frekuensi $1513,19$, $1462,20$, dan $1057,87\text{ cm}^{-1}$. Pita sempit pada $2973,96$, $2869,11$, $1649,65$, $1513,19$, dan $1462,20\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya karbon karbonil cincin (C=C), yang mengindikasikan adanya ikatan hidrogen. Kehadiran C=C aromatik dan peregangan konjugat C=O dalam HRFS terdeteksi oleh puncak pada bilangan gelombang $1649,65\text{ cm}^{-1}$. Adanya regangan konjugasi C-H pada HRFS terdeteksi dengan adanya puncak pada bilangan gelombang $2889,11$ dan 2973 cm^{-1} (Nandiyanto et al., 2019).



Gambar 2.8. Spektra TEFS1 dibandingkan dengan Kuersetin dan Hispidulin Scan Lamda dengan pelarut akuades: asam asetat: AIC3 (A) Kuersetin, (B) TEFS1, (C) Kuersetin dan TEFS1. Scan Lamda dengan pelarut metanol (D) Hispidulin, (E) TEFS1, (F) Hispidulin dan TEFS1



Gambar 2.9. Spektra FTIR TEFS1

Tabel 2.3. Panjang gelombang dan gugus fungsional pada TEFS1

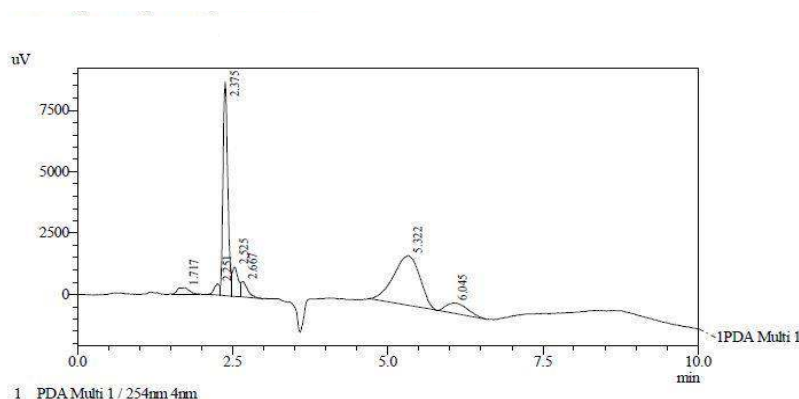
No	Panjang gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsional
1	3441,01	O-H, C-H <i>stretching</i>
2	3005,1	O-H, C-H <i>stretching</i>
3	2926,01	C-H <i>stretching</i>
4	2854,65	C-H <i>stretching</i>
5	2750,49	C-H <i>stretching</i>
6	2353,16	C=C <i>stretching</i>
7	1863,24	C=O <i>bending</i>
8	1714,72	C=O <i>bending</i>
9	1633,71	C=C <i>bending</i>
10	1462,04	C-H, C=O <i>bending</i>
11	1377,17	C-H <i>bending</i>
12	1105,21	C-O <i>stretching</i>
13	810,1	C=C <i>bending</i>

2.4.3.3 Karakterisasi menggunakan UFLC

Berdasarkan hasil kromatogram pada TEFS1 pendeteksian pada panjang gelombang 254 nm terdapat 3 puncak dengan waktu retensi 1,717, 2,251, dan 2,375 menit, dimana salah satu puncak diyakini sebagai waktu retensi senyawa hispidulin

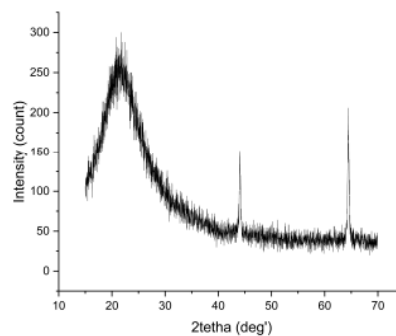
Tabel 2.4. Kromatogram UFLC menggunakan UFLC

Peak	Ret.Time	Area	Height	Area%	Height%
1	1.717	3366	264	2.515	1.932
2	2.251	2701	451	2.018	3.295
3	2.375	46100	8708	24.446	63.668

**Gambar 2.10.** Spektra UFLC TEFS1

2.4.3.5 Karakterisasi dengan difraksi XRD

Difraksi sinar-X (XRD) adalah metode yang efektif dan tidak merusak yang digunakan untuk menganalisis bahan. Metode ini memberikan wawasan yang berharga mengenai struktur, fase, dan banyak sifat struktural dari bahan (Bunaciu et al., 2015). Analisis difraksi menunjukkan bahwa TEFS1 dan formulasinya memiliki struktur amorf, seperti yang ditunjukkan oleh h (Gambar 7B). Gambar 7B menyajikan analisis XRD, yang menunjukkan puncak yang amorf HRFS pada rentang difraktogram 20-70. Puncak pada 22 tetha merupakan karakteristik dari TEFS1. Sedangkan puncak 44 dan 64,5 merupakan pengotor dari instrumen yang digunakan.



Gambar 2.11. Spektra XRD TEFS1

2.4.3.6 Penentuan kadar hispidulin dalam fraksi

Berdasarkan hasil pengukuran serapan didapatkan bahwa konsentrasi hispidulin dalam TEFS1 adalah $49,1 \pm 1,0\%$. Karena hal itu, maka EFS1 selanjutnya disebut sebagai *Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua* (HRFS).

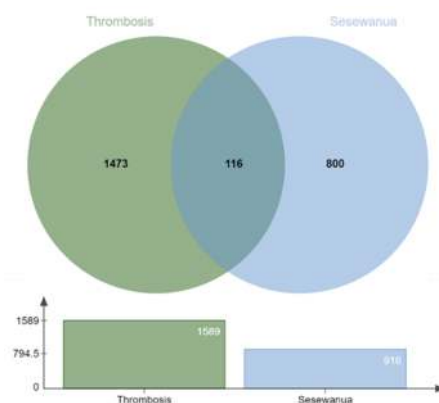
Hispidulin memperpanjang nilai PT maupun aPTT dengan menghambat faktor koagulasi yang terlibat dalam jalur ekstrinsik, intrinsik dan jalur bersama. Pemeriksaan hubungan struktur-aktivitas mengungkapkan bahwa aktivitas antiagregasi flavonoid sangat dipengaruhi oleh struktur cincin C sebagai penentu klasifikasi senyawa. Adanya ikatan rangkap antara atom karbon 2 dan 3 dan gugus keto pada karbon C4 dalam HIS (golongan flavon) meningkatkan efek antiagregasi flavonoid melalui pengikatan pada TxA2 (Ahmed et al., 2020; Brodsky et al., 2018; Choxi et al., 2022).

2.4.4 Uji *in silico*

2.4.4.1 Penggalian data protein terkait trombosis dan prediksi target potensial

Pendekatan *in silico* menjadi sangat penting dalam penemuan obat karena dapat mengungkap penyakit dan *protein-protein interaction* (PPI) serta jalurnya, mengidentifikasi protein target dan untuk rasionalisasi desain obat yang dapat mempengaruhi protein (Murakami et al., 2017)

Beberapa basis data yang berbeda digunakan dalam penelitian ini untuk mencari protein yang terlibat dalam trombosis. Dalam hal ini, kami menggunakan *GeneCard* (nilai *cutoff* >1), DisGeNet (*cutoff* >0,1), dan database OMIM, memperoleh total 1589 protein yang berhubungan dengan trombosis (setelah menghilangkan data yang terduplikasi). Sementara itu, prediksi target potensial senyawa *Sesewanua* dilakukan dengan menggunakan tiga senyawa *Sesewanua* yang teridentifikasi dalam fraksi yaitu hispidulin, verbascoside, dan isoverbascoside yang selanjutnya diambil dari basis data *PubChem*. Analisis target potensial senyawa dilakukan dengan menggunakan *PharmMapper* dan *SwissTargetPrediction*. Dalam analisis ini, kami mempertimbangkan untuk menghapus protein yang memiliki skor <0, sehingga menghasilkan 916 protein yang menjadi target fitokonstituen. Analisis persimpangan protein yang terkait dengan trombosis dan senyawa *Sesewanua* menghasilkan 116 protein yang menjadi target potensial Gambar 2.12.

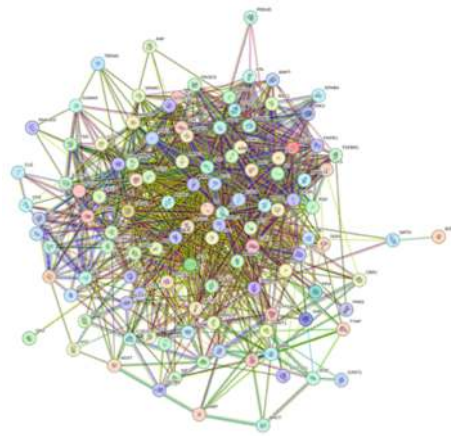


Gambar 2.12. Target potensial senyawa *Sesewanua* dalam trombosis

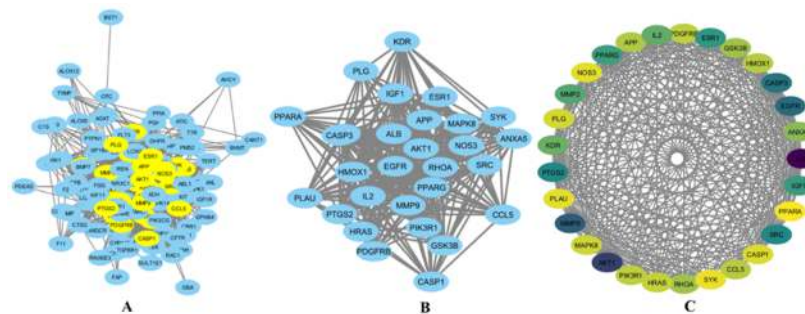
2.4.4.2 Protein-protein Interaction (PPI) network dan analisis topologi

Analisis PPI *network* dan topologi 116 protein target potensial dilakukan dengan menggunakan basis data STRING (alat berbasis online) dan paket perangkat lunak *cytoscape*. Analisis jaringan PPI menghasilkan 115 node dan 1373 edge (satu protein target dihilangkan karena tidak berinteraksi dengan jaringan utama atau protein lain) dapat dilihat pada gambar 2.13.

Selanjutnya, analisis topologi protein dilakukan dengan menggunakan data 116 protein potensial yang diekspor dari STRING, untuk dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan *cytoscape*. Tiga parameter utama yang kami gunakan dalam analisis ini adalah *Degree* (DC), *Betweenness Centrality* (BC), dan *Closeness Centrality* (CC) dengan nilai masing-masing $DC \geq 25$, $BC \geq 0.006$ dan $CC \geq 0.564$ yang menghasilkan total 29 node dan 230 edge. Ke-29 node protein tersebut kemudian diusulkan sebagai protein yang berperan penting dalam trombosis (Tabel 2.5) dan selanjutnya divisualisasikan dalam bentuk *cytoscape* berdasarkan derajatnya (Gambar 2.14). *Cytoscape* merupakan program perakitan dan visualisasi jaringan yang kuat untuk menganalisis topologi jaringan biologis dan kemampuan kontrol yang membantu peneliti memberi gambaran tentang sistem molekuler yang kompleks dan target obat yang potensial (H. Liu et al., 2014).



Gambar 2.13. PPI dari 116 protein potensial pada trombosis yang ditargetkan oleh fitokostituen *Sesewanua* yang dibangun oleh STRING



Gambar 2.14. Analisis topologi protein target potensial pada trombosis yang ditargetkan oleh senyawa *Sesewanua* (A) 116 protein potensial, (B) 29 protein node dengan 230 node setelah penyaringan dengan tiga parameter DC, BC dan CC (C) 29 protein kunci yang dinilai berdasarkan derajat (ungu adalah nilai DC yang lebih tinggi).

Tabel 2.5. Analisis topologi dari 29 protein terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa *Sesewanua*

Target	Simbol	Degree	Betweenness	Closeness
Insulin Like Growth Factor 1	IGF1	55	0.0164	0.6477
Sarcoma	SRC	60	0.0324	0.6667
Spleen Associated Tyrosine Kinase	SYK	31	0.0083	0.5644
Serum Albumin	ALB	88	0.1776	0.8143

Target	Simbol	Degree	Betweenness	Closeness
Estrogen Receptor 1	ESR1	56	0.0403	0.6590
Annexin A5	ANXA5	44	0.0133	0.6096
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha	PPARA	29	0.0081	0.5672
AKT Serine/Threonine Kinase 1	AKT1	75	0.0673	0.7451
CC Motif Chemokine Ligand 5	CCL5	38	0.0109	0.5938
Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS	36	0.0061	0.5846
Nitric Oxide Synthase 3	NOS3	32	0.0109	0.5758
Caspase 3	CASP3	64	0.0259	0.6909
Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	PIK3R1	37	0.0144	0.5758
Heme Oxygenase 1	HMOX1	38	0.0063	0.5876
Interleukin 2	IL2	49	0.0216	0.6333
Matrix Metalloproteinase 2	MMP2	51	0.0168	0.6298
Plasminogen activator urokinase	PLAU	32	0.0103	0.5700
Mitogen-Activated Protein Kinase 8	MAPK8	35	0.0064	0.5816
Glycogen Synthase Kinase 3 Beta	GSK3B	41	0.0103	0.6000
Plasminogen	PLG	34	0.0091	0.5729
Ras homolog family member A	RHOA	41	0.0087	0.6000
Platelet derived growth factor receptor beta	PDGFRB	37	0.0078	0.5846
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	PPARG	54	0.0160	0.6477
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	60	0.0342	0.6706
Caspase 1	CASP1	33	0.0082	0.5700
Kinase Insert Domain Receptor	KDR	48	0.0078	0.6230
Amyloid Beta Precursor Protein	APP	39	0.0133	0.5969
Matrix Metalloproteinase 9	MMP9	69	0.0447	0.7037

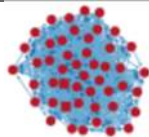
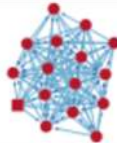

Target	Simbol	Degree	Betweenness	Closeness
Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR	66	0.0425	0.6909


2.4.4.3 Membuat *Compound-Target* (CT) network dan identifikasi protein Hub

CT *network* dibangun dari protein cluster fungsional utama yang diperoleh dari analisis clustering menggunakan plugin MCODE pada *cytoscape*. Hasilnya, kami menemukan lima modul hasil klaster, dan modul 1 memiliki nilai MCODE yang lebih tinggi, yaitu 29,404 dengan 48 node dan 691 edge (Tabel 2.6).

Identifikasi hub dianalisis menggunakan plugin cytoHubba dengan menggunakan empat parameter yaitu *degree*, *betweenness*, *closeness* dan MNC untuk mengidentifikasi 10 gen hub teratas dan 5 target potensial. Hasilnya, kami menemukan 10 protein teratas yang memiliki nilai tertinggi pada empat parameter adalah AKT1, CASP3, ALB, MMP9, EGFR, SRC, PTGS2, ESR1, PPARG, IGF1 (tabel 2.7) dan lima protein teratas dipilih untuk analisis lebih lanjut (gambar 2.15), yaitu AKT1 (PDB 3096), CASP3 (PDB 1NME), ALB (PDB 2BXF), dan MMP9 (PDB 1GKC). Protein-protein ini kemudian dijadikan sebagai target utama senyawa *Sesewanua* dalam mencegah dan mengobati trombosis. Keempat protein tersebut mencegah terjadinya trombosis melalui mekanisme inaktivasi platelet (Kaneider et al., 2010a; Kopec et al., 2018a; Lopez et al., 2014a; O'Brien et al., 2011a; Paar et al., 2017a).

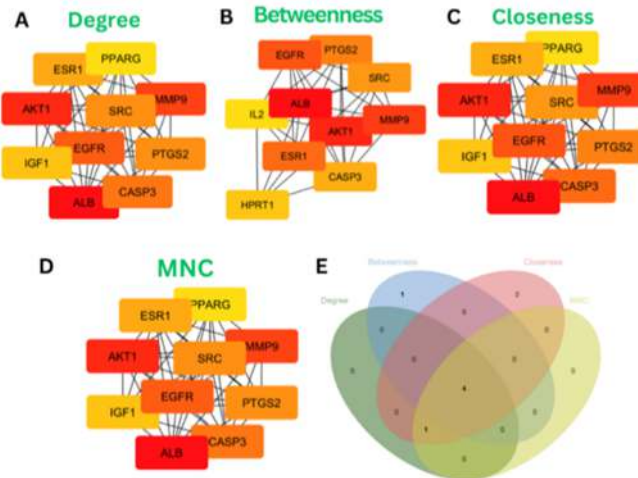
Tabel 2.6. Pengelompokan yang mengindikasikan modul-modul jaringan interaksi protein-protein dari target umum senyawa *Sesewanua* pada trombosis yang dianalisis dengan algoritma MCODE

Module	MCODE Score	Node	Edge
	29.404	48	691
	13.333	16	100
	4.8	6	12

	3.6	11	18
	3.33	4	5

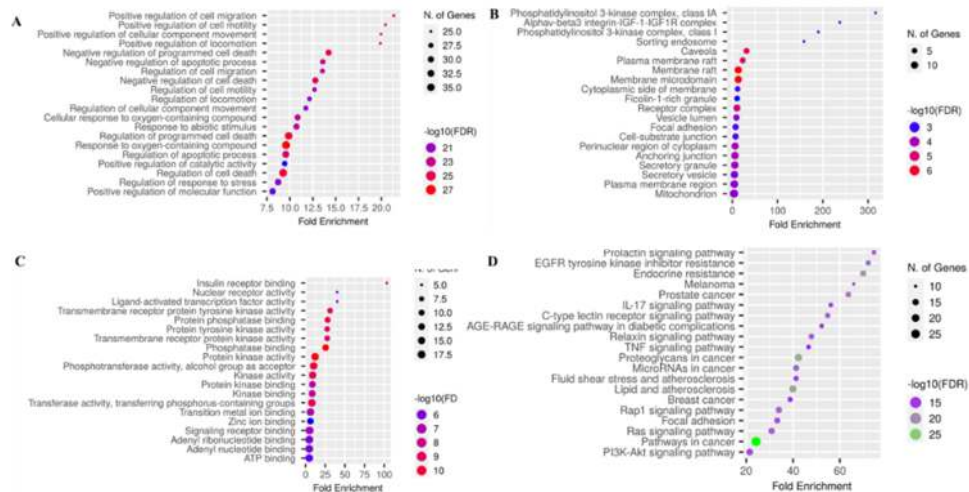
Tabel 2.7. 10 protein potensial trombosis yang ditargetkan oleh Sesewanua dengan masing-masing empat nilai parameter seperti derajat, antara, kedekatan, MNC

Protein	Skor			
	<i>Degree</i>	<i>Betweenness</i>	<i>Closeness</i>	MNC
AKT1	47	69.83	47	47
CASP3	46	63.11	46.5	46
ALB	45	59.01	46	45
MMP9	43	51.24	45	43
EGFR	43	47.47	45	43
SRC	43	46.02	45	43
PTGS2	42	48.46	44.5	42
ESR1	41	38.48	44	41
PPARG	41	45.37	44	41
IGF1	39	36.26	43	39

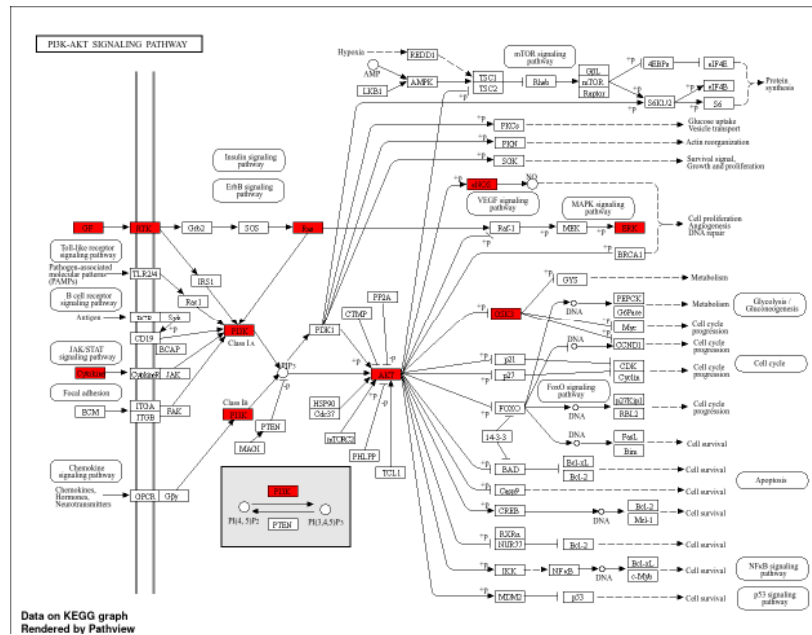


Gambar 2.15 10 protein target inti teratas yang diidentifikasi berdasarkan (A) Derajat, (B) Keantaraan (C) Kedekatan dan (D) MNC, (E) Tumpang tindih dari 5 target potensial protein terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa *Sesewanua*

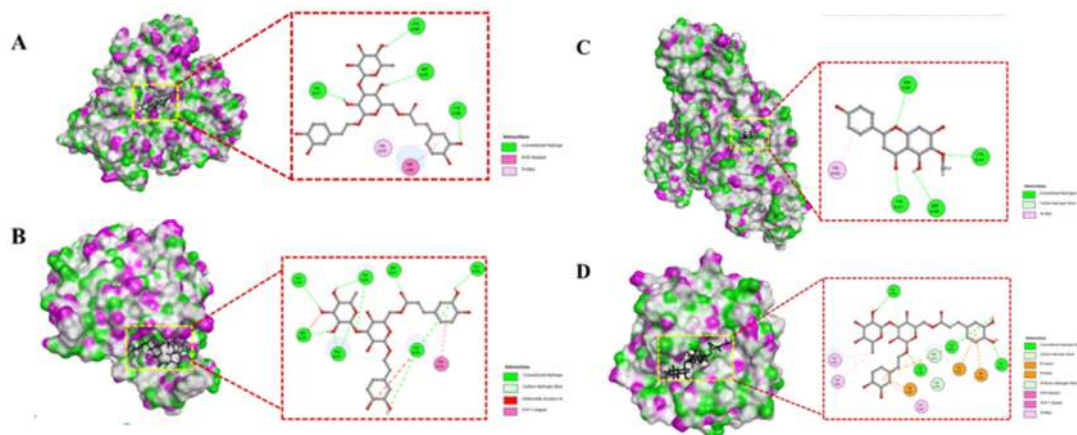
2.4.4.4 Ontologi Gen, pengayaan jalur KEGG, dan *Molekular Docking*



Gambar 2.16. Pengayaan ontologi gen dan jalur KEGG dari protein kluster fungsional utama trombosis yang ditargetkan oleh senyawa *Sesewanua* (p -value 0,01). (A) 20 besar proses biologis (B) 20 besar komponen seluler (C) 20 besar fungsi molekuler (D) 20 besar jalur KEGG. Ukuran titik-titik menunjukkan jumlah gen yang terkait. Warna menggambarkan nilai- p



Gambar 2.17. Peta jalur terpadu senyawa *Sesewanua* dalam pengobatan trombosis terutama pada jalur pensinyalan PI3K-AKT. Tanda merah adalah protein target fungsional utama dari senyawa *Sesewanua*



Gambar 2.18. Hasil docking 3D dan 2D antara protein utama terkait trombosis yang ditargetkan oleh senyawa *Sesewanua* dengan skor terbaik. (A) AKT1-isoverbascoside (B) CASP3-isoverbascoside (C) ALB-Hispidulin (D) MMP9-isoverbascoside

Tabel 2.8. *Docking* dari empat protein potensial terkait trombosis dengan senyawa *Sesewanua*

Protein	Ligand	Binding energy (kcal/mol)	Binding Residues	
			Hydrogen Bond	Other Bond
AKT1 (PDB : 3O96)	Native	-14.4	-	TRP80, ILE84, LEU210, LEU264, LYS268, VAL270, ARG273
	Warfarin	-9.1	THR81, THR82, VAL271	GLN79, TRP80, VAL270
	Hispidulin	-9.4	ASN54, SER205, LYS268	TRP80, LYS268, VAL270
	Verbascoside	-9.8	ASN54, THR211, VAL271, TYR272, TYR326	TRP80, ILE84, LEU264, ARG273
	Isoverbascoside	-10.6	VAL271, LYS268, ASP292, CYS296	TRP80, LYS268, VAL270
CASP3 (PDB : 1NME)	Native	-5.7	ARG207, ASN208, SER209	TRP206
	Warfarin	-6.6	TYR204, ARG207	CYS163, TYR204, TRP206, ARG207
	Hispidulin	-6.4	TRP214	TRP206, ASN208, GLU248
	Verbascoside	-6.9	THR62, SER65, TYR204, ARG207, SER209	HIS121, ARG207

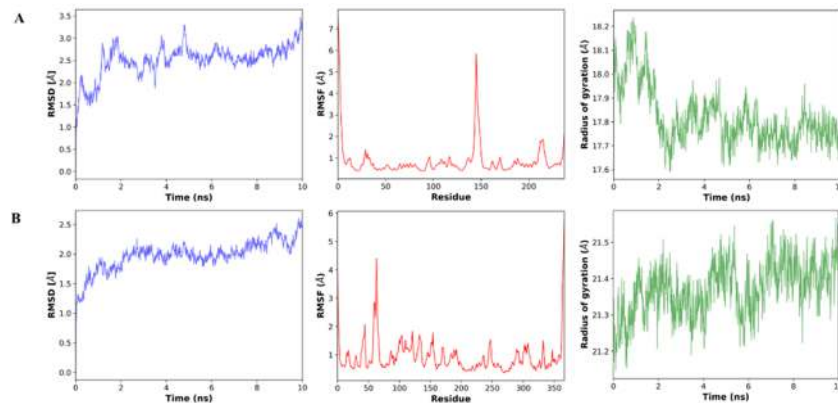
	Isoverbascoside	-7.4	CYS163, TYR204, SER205, ARG207, GLU248, PHE250, SER251	SER205, ARG207, TRP214, PHE250
	Native	-9.7	TYR411	LEU387, ILE388, CYS392, LEU407, VAL433, CYS438, ALA449, LEU453
	Warfarin	-8.6	TYR411	PRO384, LEU387, ILE388, CYS392, VAL433, CYS438, ALA449, LEU453
ALB (PDB : 2BXF)	Hispidulin	-7.8	ASN391, TYR411, LYS41, SER489	VAL433, SER489
	Verbascoside	-6.9	ILE388, ASN391, CYS392, GLU450, ARG485, SER489	LEU387, ILE388, CYS392, LEU407, VAL433, CYS438
	Isoverbascoside	-6.4	ILE388, CYS392, LYS414, ARG485, SER489	ILE388, LEU407, VAL430, VAL433, ALA449, LEU453
MMP9 (PDB : 1GKC)	Native	-7.1	GLY186, LEU188, HIS401, HIS405, HIS411, PRO421, TYR423	LEU188, TYR393, HIS401, GLU402, HIS411, TYR423

Warfarin	-9.5	LEU188, ALA189, PRO421	LEU188, VAL389, HIS401, GLU402, HIS411, TYR423
Hispidulin	-8.3	ALA191, HIS401	PHE110, HIS190, VAL398, HIS401, HIS411
Verbascoside	-8.3	GLY186, LEU188, ALA189, TYR393, LEU397, LEU418, TYR420	GLY186, TYR393, VAL398, HIS401, HIS405, HIS411, TYR423
Isoverbascoside	-9.2	GLY186, LEUQ88, ALA191, GLU402	GLY186, ALA189, TYR393, VAL398, HIS401, HIS405, HIS411, PRO421, TYR423

Hasil *molekular docking* menunjukkan bahwa tiga senyawa *Sesewanua* berikatan dengan AKT1, CASP3, ALB dan MMP9 melalui ikatan hidrogen, Pi-Pi *stacked*, Pi-alkil, Pi-Pi *shaped*, Pi-kation, Pi-anion, Pi-donor hidrogen, dan ikatan karbon-hidrogen. Energi pengikatan yang lebih negatif dari warfarin memberi makna bahwa senyawa-senyawa yang terkandung pada fraksi *Sesewanua* ini memiliki ikatan yang lebih baik dibandingkan dengan warfarin. AKT 1 merupakan protein yang berperan dalam aktivasi pletelet. CASP3 (Caspase 3) merupakan aktivator *Tissue Factor* yang merupakan awal dari proses pembekuan darah. ALB (Albumin) menghambat proses koagulasi dengan mengikat antitrombin yang selanjutnya dihubungkan dengan netralisasi faktor pembekuan Xa dan efek penghambatan pada bersatunya platelet. Aktivasi monosit oleh fibrinogen meningkatkan sekresi MMP9 (metaloproteinase-9). MMP-9 sendiri meningkatkan koagulasi monosit melalui mekanisme autokrin (Kaneider et al., 2010b; Kopec et al., 2018b; Lopez et al., 2014b; O'Brien et al., 2011b; Paar et al., 2017b).

2.4.4.5 Dinamika molekular

Analisis dinamika molekular dilakukan untuk menganalisis stabilitas dan dinamika interaksi ligan-protein dalam kompleks doking ligan-protein teratas (menunjukkan afinitas tinggi dan energi pengikatan rendah). Dinamika molekular disimulasikan selama 5 ns untuk menganalisis *Root Means Square Deviations* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), dan radius girasi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.19, fluktuasi nilai RMSD dari 2 kompleks senyawa-reseptor Isoverbascoside-AKT1 dan isoverbascoside-CASP3 masing masing memperlihatkan nilai yang baik yakni kurang dari 3,5 Å dan 2,5 Å, yang menunjukkan stabilitas dan fleksibilitas pengikatan yang relatif stabil. Nilai RMSD semakin mendekati 0 akan lebih baik. Pada gambar tersebut, RMSD interaksi isoverbascoside-AKT1 pada awalnya meningkat hingga mencapai diatas 2.5 Å, kemudian landai pada 2-10 ns yang mengindikasikan bahwa interaksi tersebut telah mencapai kesetimbangan. Fase kesetimbangan isoverbascoside-CASP3 diprediksi pada 2 hingga kira kira 9 ns (Wahyu & Ningrat, 2022).



Gambar 2.19. RMSD, RMSF dan radius girasi kompleks protein-ligan terpilih (daun *Sesewanua*) selama stimulasi dinamik molekular (A) isoverbascoside-AKT1 (B) isoverbascoside-CASP3

Parameter RSMF digunakan untuk mengevaluasi kestabilan interaksi ligan-enzim pada simulasi dinamika molekular. Isoverbascoside-CASP3 relatif lebih stabil dibandingkan dengan isoverbascoside-AKT1. Analisis terhadap radius girasi memberi gambaran perubahan ukuran protein selama radiasi. Semakin besar radius girasi maka semakin besar proteinnya. Radius girasi isoverbacoside-AKT1 cenderung menurun sedangkan pada isoverbascoside-CASP3 cenderung meningkat. Hal ini senada dengan nilai RMSD isoverbascoside-CASP3 yang lebih kecil dibandingkan dengan isoverbacoside-AKT1 (Kaharudin et al., 2022; Lelita et al., 2017; Zubair et al., 2020)

2.5 Kesimpulan

Ekstrak dan fraksi *Sesewanua* memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Efek antikoagulan TEFS1 menunjukkan signifikansi farmakologisnya sebagai obat antikoagulan herbal dengan menghambat jalur ekstrinsik dan intrinsik yang ditunjukkan dengan meningkatnya nilai PT dan aPTT. TEFS1 mengandung hispidulin pada konsentrasi $49,1 \pm 1,0\%$ sehingga disebut sebagai *Hispidulin Rich Fraction of Sesewanua* (HRFS). Studi *in silico* terhadap 3 senyawa *Sesewanua* yaitu hispidulin, verbascoside, dan isoverbascoside untuk terhadap protein AKT1, CASP3, ALB, dan MMP9 memberikan afinitas pengikatan dan stabilitas dinamika molekuler yang baik. Studi eksperimental dan komputasi mendukung efek *Sesewanua* pada gangguan trombosis. Studi lebih lanjut diperlukan untuk melakukan formulasi HRFS dalam bentuk sediaan transdermal.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S., Zimba, O., & Gasparyan, A. Y. (2020). Thrombosis in Coronavirus disease 2019 (COVID-19) through the prism of Virchow's triad. *Clinical Rheumatology*, 39(9), 2529–2543. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05275-1>
- Aliyah, Aswad, M., Hajrah, & Permana, A. D. (2021). Development and validation of spectrophotometric methods for quantitative determination of total phenolic and total flavonoid content of lyophilizate of the leaf of sweet potato leaf. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(2). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022067>
- Almeida, M. J., Guillaumon, A. T., Miquelin, D., Joviliano, E. E., Hafner, L., Sobreira, M. L., Geiger, M. A., Moura, R., Raymundo, S., & Yoshida, W. B. (2019). Guidelines for superficial venous thrombosis. *Jornal Vascular Brasileiro*, 18. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.180105>
- Amarnani, R., & Shende, P. (2022). Microneedles in diagnostic, treatment and theranostics: An advancement in minimally-invasive delivery system. *Biomedical Microdevices*, 24(1). <https://doi.org/10.1007/s10544-021-00604-w>
- Andrade, G. P. V., Lima, M. A., De Souza, A. A., Fareed, J., Hoppensteadt, D. A., Santos, E. A., Chavante, S. F., Oliveira, F. W., Rocha, H. A. O., & Nader, H. B. (2013). A heparin-like compound isolated from a marine crab rich in glucuronic acid 2-O-sulfate presents low anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.069>
- Anjani, Q. K., Permana, A. D., Cárcamo-Martínez, Á., Domínguez-Robles, J., Tekko, I. A., Larrañeta, E., Vora, L. K., Ramadon, D., & Donnelly, R. F. (2021). Versatility of hydrogel-forming microneedles in in vitro transdermal delivery of tuberculosis drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 158, 294–312. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.12.003>
- Anjani, Q. K., Sabri, A. H. Bin, Utomo, E., Domínguez-Robles, J., & Donnelly, R. F. (2022). Elucidating the Impact of Surfactants on the Performance of Dissolving Microneedle Array Patches. *Molecular Pharmaceutics*, 19(4), 1191–1208. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00988>
- A.R.Abubakar, & Mainul Haque. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10.
- Arista Indraswari. (2008). *Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.) Menggunakan Metode Maserasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid.*
- Arshad, M. S., Zafar, S., Zahra, A. T., Zaman, M. H., Akhtar, A., Kucuk, I., Farhan, M., Chang, M. W., & Ahmad, Z. (2021). Fabrication and characterisation of self-applicating heparin sodium microneedle patches.

Journal of Drug Targeting, 29(1), 60–68.
<https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1795180>

- Ascenso, A., Pinho, S., Eleutério, C., Praça, F. G., Bentley, M. V. L. B., Oliveira, H., Santos, C., Silva, O., & Simões, S. (2013). Lycopene from tomatoes: Vesicular nanocarrier formulations for dermal delivery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7284–7293.
<https://doi.org/10.1021/jf401368w>
- Aung, N. N., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Patrojanasophon, P., Opanasopit, P., & Pamornpathomkul, B. (2021). Enhancement of transdermal delivery of resveratrol using Eudragit and polyvinyl pyrrolidone-based dissolving microneedle patches. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102284>
- Balestrin, L. A., Kreutz, T., Fachel, F. N. S., Bidone, J., Gelsleichter, N. E., Koester, L. S., Bassani, V. L., Braganhol, E., Dora, C. L., & Teixeira, H. F. (2021). Achyrocline satureioides (Lam.) dc (asteraceae) extract-loaded nanoemulsions as a promising topical wound healing delivery system: In vitro assessments in human keratinocytes (hacat) and het-cam irritant potential. *Pharmaceutics*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081241>
- Barile, F. A. (2010). Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.01.001>
- Barung, E. N., Kalonio, D. E., Banne, Y., & Kambuno, N. T. (2021). Anticancer activities of sesewanua leaf extracts (Clerodendrum fragrans (vent.) willd) against a549 lung cancer cell. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9, 1226–1230.
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.7484>
- Batista-Duharte, A., Jorge Murillo, G., Pérez, U. M., Tur, E. N., Portuondo, D. F., Martínez, B. T., Téllez-Martínez, D., Betancourt, J. E., & Pérez, O. (2016). The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. *International Journal of Toxicology*, 35(6), 627–633.
<https://doi.org/10.1177/1091581816672187>
- Bauersachs, R., Zeymer, U., Brière, J. B., Marre, C., Bowrin, K., & Huelsebeck, M. (2019). Burden of Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease: A Literature Review. *Cardiovascular Therapeutics*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/8295054>
- Bergfeld, F. A. C. P. ;, Donald, V., Belsito, D. E., Cohen, C. D., Klaassen, A. E., Rettie, D., Ross, T. J., Slaga, P. W., Snyder, D. V. M., & Tilton, S. C. (2024). *Safety Assessment of Fatty Amphocarboxylates as Used in Cosmetics*. www.cir-safety.org
- Brodsky, S., Eikelboom, J., & Hebert, L. A. (2018). *Anticoagulant-Related Nephropathy*. 1–7. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018070741>

- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Vol. 45, Issue 4, pp. 289–299). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- Butarbutar, R. S. (2013). Pengaruh Aktivitas Wisatawan Terhadap Keanekaragaman Tumbuhan Di Sulawesi. *Journal of Indonesian Tourism and Development Studies*, 1(2), 87–96. <https://dokumen.tips/download/link/jitode-vol-1-no-2-2013pdf>
- Camire, R. M. (2021). Blood coagulation factor X: molecular biology, inherited disease, and engineered therapeutics. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 52(2), 383–390. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02456-w>
- Chee, Y. L. (2014). Coagulation. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 44(1), 42–45. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2014.110>
- Chekalina, N., Burmak, Y., Petrov, Y., Borisova, Z., Manusha, Y., Kazakov, Y., & Kaidashev, I. (2018). Quercetin reduces the transcriptional activity of NF- κ B in stable coronary artery disease. *Indian Heart Journal*, 70(5), 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.04.006>
- Cheng, A., Sun, W., Xing, M., Zhang, S., & Gao, Y. (2022). The hygroscopicity of polymer microneedles on the performance of dissolving behavior for transdermal delivery. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(1), 72–78. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798442>
- Chi, J., Sun, L., Cai, L., Fan, L., Shao, C., Shang, L., & Zhao, Y. (2021). Chinese herb microneedle patch for wound healing. *Bioactive Materials*, 6(10), 3507–3514. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.023>
- Choi, J. H., Kim, D. W., Park, S. E., Lee, H. J., Kim, K. M., Kim, K. J., Kim, M. K., Kim, S. J., & Kim, S. (2015). Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(2), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.012>
- Choxi, R., Kapoor, K., MacKman, N., & Jovin, I. S. (2022). Direct Oral Anticoagulants and Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(5), 553–564. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.317171>
- De Pablo-Moreno, J. A., Liras, A., & Revuelta, L. (2022). Standardization of Coagulation Factor V Reference Intervals, Prothrombin Time, and Activated Partial Thromboplastin Time in Mice for Use in Factor V Deficiency Pathological Models. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.846216>
- Dehghani, F., Vafa, M., Ebrahimkhani, A., Găman, M. A., & Sezavar Seyedi Jandaghi, S. H. (2023). Effects of quercetin supplementation on endothelial dysfunction biomarkers and depression in post-myocardial

- infarction patients: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, 56, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.04.019>
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2017). *Herb Pharmacopoeia of Indonesia* (II). Health Department of Indonesia.
- Ding, W., Shao, X., Ding, S., Du, Y., Hong, W., Yang, Q., Song, Y., & Yang, G. (2024). Natural herb wormwood-based microneedle array for wound healing. *Drug Delivery and Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01520-1>
- Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2013). Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 172(2), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.025>
- Donnelly, R. F., T.R. Singh, D.I.J Morrow, & A.D. Woolfson. (2012). *Microneedle-mediated and Intradermal*. Wiley-Blackwell.
- Elim, D., Fitri, A. M. N., Mahfud, M. A. S. ban, Afika, N., Sultan, N. A. F., Hijrah, Asri, R. M., & Permana, A. D. (2023). Hydrogel forming microneedle-mediated transdermal delivery of sildenafil citrate from polyethylene glycol reservoir: An ex vivo proof of concept study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113018>
- Enggi, C. K., Satria, M. T., Nirmayanti, N., Usman, J. T., Nur, J. F., Asri, R. M., Djide, N. J. N., & Permana, A. D. (2023). Improved transdermal delivery of valsartan using combinatorial approach of polymeric transdermal hydrogels and solid microneedles: an ex vivo proof of concept investigation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 34(3), 334–350. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2121590>
- Fikriyah, Y. U., & Nasution, R. S. (2021). Analisis Kadar Air dan Kadar Abu pada Teh Hitam yang Dijual di Pasaran dengan Menggunakan Metode Gravimetri. *Amina*, 3(2), 50–54.
- Frydman, G. H., Olaleye, D., Annamalai, D., Layne, K., Yang, I., Kaafarani, H. M. A., & Fox, J. G. (2020). Manuka honey microneedles for enhanced wound healing and the prevention and/or treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) surgical site infection. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70186-9>
- Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>
- Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J., & Swies, J. (1987). On the Mechanism of Antithrombotic Action of Flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 36(3), 317–322.

- Gustari, R. A. (2021). *Uji Daya Hambat Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air dari Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (Syzygium aromaticum (L.) Merrill & Perry) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis*. Universitas Jenderal Achmad Yani.
- Haghniaz, R., Kim, H. J., Montazerian, H., Baidya, A., Tavafoghi, M., Chen, Y., Zhu, Y., Karamikamkar, S., Sheikhi, A., & Khademhosseini, A. (2023). Tissue adhesive hemostatic microneedle arrays for rapid hemorrhage treatment. *Bioactive Materials*, 23, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.08.017>
- Hanny Ferry Fernanda, M., Suryandari, M., Puji Lestari Sudarwati Program Studi Diploma Tiga Farmasi, T., & Farmasi Surabaya, A. (2021). Fraksinasi dan Identifikasi Ekstrak Daun Mitragyna Speciosa Menggunakan Metode Kromatografi. *FARMASIS: Jurnal Sains Farmasi*, 2(2).
- Hanumegowda, S. M., Srinivasa, C., Shivaiah, A., M.Venkatappa, M., Santhosh, S., R, R., Gonchigar, S. J., & Sannanigaiah, D. (2023). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Kenaf Seed (Hibiscus cannabinus) Coat Ethanol Extract in Sprague Dawley Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(2), 772–800. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04144-8>
- Hasan, N., Nur Fatimah, S., Raihan, M., Zaenal Mustopa, A., Irawan, H., & Rahmat Haedar, J. (2023). Isolasi dan Identifikasi Ethyl p-Methoxycinnamate (EPMC) dari Rimpang Kencur (Kaempferia galanga) sebagai Kandidat Senyawa Antikanker. *Majalah Farmasi Dan Farmakologi*, 27(3), 140–146. <https://doi.org/10.20956/mff.v27i3.28335>
- He, C., Fang, Z., Wu, H., Li, X., Cheng, L., Wen, Y., & Lin, J. (2024). A flexible and dissolving traditional Chinese medicine microneedle patch for sleep-aid intervention. *Heliyon*, 10(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33025>
- Hidayatullah, T., Nasir, F., Khattak, M. A., Pervez, S., Almalki, W. H., Alasmari, F., Maryam, G. e., Rahman, A. ur, & Ali, A. T. (2023). Hybrid Dissolving Microneedle-Mediated Delivery of Ibuprofen: Solubilization, Fabrication, and Characterization. *Pharmaceuticals*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/ph16050677>
- Huliselan, Y. M., Runtuwene, M. R. J., & Wewengkang, D. S. (2015). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan n-Hexan dari Daun Sesewanua (Clerodendron squamatum Vahl.). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 4(3).
- Irawati, D; Kinho, J. (2015). Keragaman Tumbuhan Berkhasiat Obat di hutan Pantai Cagar Alam Tangkoko. *Jurnal Wasian*, 2(1), 01–08.
- Jumiarni, W. O., & Komalasari, O. (2017). Inventory of Medicines Plant As Utilized By Muna Tribe in Kota Wuna Settlement. *Majalah Obat Tradisional*, 22(1), 45. <https://doi.org/10.22146/tradmedj.24314>

- Kabashneh, S., Singh, V., & Alkassis, S. (2020). A Comprehensive Literature Review on the Management of Distal Deep Vein Thrombosis. *Cureus*, 12(5), 10–13. <https://doi.org/10.7759/cureus.8048>
- Kaharudin, C. L., Afkauni, A. A., Pramudyansyah, A. Y., & Prasetyo, N. (2022). Penambatan Molekul dan Simulasi Dinamika Molekular Kandungan Minyak Kayu Manis dan Minyak Serai Dapur Sebagai Antibakteri Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 18(2), 140. <https://doi.org/10.20961/alchemy.18.2.54997.140-147>
- Kalaitzopoulos, D. R., Panagopoulos, A., Samant, S., Ghalib, N., Kadillari, J., Daniilidis, A., Samartzis, N., Makadia, J., Palaiodimos, L., Kokkinidis, D. G., & Spyrou, N. (2022). Management of venous thromboembolism in pregnancy. In *Thrombosis Research* (Vol. 211, pp. 106–113). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.02.002>
- Kaneider, N. C., Mosheimer, B., Günther, A., Feistritzer, C., & Wiedermann, C. J. (2010a). *Enhancement of fibrinogen-triggered pro-coagulant activation of monocytes in vitro by matrix metalloproteinase-9*. <http://www.thrombosisjournal.com/content/8/1/2>
- Kaneider, N. C., Mosheimer, B., Günther, A., Feistritzer, C., & Wiedermann, C. J. (2010b). *Enhancement of fibrinogen-triggered pro-coagulant activation of monocytes in vitro by matrix metalloproteinase-9*. <http://www.thrombosisjournal.com/content/8/1/2>
- Kathuria, H., Lim, D., Cai, J., Chung, B. G., & Kang, L. (2020). Microneedles with Tunable Dissolution Rate. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(9), 5061–5068. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00759>
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). *Farmakope Herbal*.
- Kenne, E., Nickel, K. F., Long, A. T., Fuchs, T. A., Stavrou, E. X., Stahl, F. R., & Renné, T. (2015). Factor XII: A novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 278(6), 571–585. <https://doi.org/10.1111/joim.12430>
- Khandker, S. S., Alam, M., Uddin, F., Shapla, U. M., Lubna, N., Mazumder, T. A., Marzan, M., Mondal, M., Khalil, M. I., Karim, N., Shakil, M. S., & Hossen, M. S. (2022). Subchronic Toxicity Study of Alternanthera philoxeroides in Swiss Albino Mice Having Antioxidant and Anticoagulant Activities. *Journal of Toxicology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8152820>
- Khouya, T., Ramchoun, M., Amrani, S., Harnafi, H., Rouis, M., Couchie, D., Simmet, T., & Alem, C. (2020). Anti-inflammatory and anticoagulant effects of polyphenol-rich extracts from Thymus atlanticus: An in vitro and in vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112475>
- Kim, Y., Lee, H., Park, H. J., Kim, M. K., Kim, Y. Il, Kim, H. J., Bae, S. K., Kim, Y. J., & Bae, M. K. (2023). Hispidulin Inhibits the Vascular Inflammation

- Triggered by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186717>
- Ko, E. Y., Nile, S. H., Jung, Y. S., & Keum, Y. S. (2018). Antioxidant and antiplatelet potential of different methanol fractions and flavonols extracted from onion (*Allium cepa* L.). *3 Biotech*, 8(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1184-4>
- Konstantinides, S. V., Meyer, G., Bueno, H., Galié, N., Gibbs, J. S. R., Ageno, W., Agewall, S., Almeida, A. G., Andreotti, F., Barbato, E., Baumbach, A., Beygui, F., Carlsen, J., De Carlo, M., Delcroix, M., Subias, P. E., Gaine, S., Goldhaber, S. Z., Gopalan, D., ... Pepke-Zaba, J. (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European respiratory society (ERS). In *European Heart Journal* (Vol. 41, Issue 4, pp. 543–603). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz405>
- Kopec, A. K., Spada, A. P., Contreras, P. C., Mackman, N., & Luyendyk, J. P. (2018a). Caspase inhibition reduces hepatic tissue factor-driven coagulation in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences*, 162(2), 396–405. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx268>
- Kopec, A. K., Spada, A. P., Contreras, P. C., Mackman, N., & Luyendyk, J. P. (2018b). Caspase inhibition reduces hepatic tissue factor-driven coagulation in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences*, 162(2), 396–405. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx268>
- Kristina Enggi, C., Sulistiawati, S., Stephanie, S., Tangdilintin, F., Anas Achmad, A., Adelia Putri, R., Burhanuddin, H., Arjuna, A., Manggau, M. A., & Dian Permana, A. (2023). Development of probiotic loaded multilayer microcapsules incorporated into dissolving microneedles for potential improvement treatment of vulvovaginal candidiasis: A proof of concept study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 648, 203–219. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.05.165>
- Kwame Adosraku, R., Kyekyeku, J. O., & Attah, I. Y. (2013). Characterization and HPLC Quantification of Piperine Isolated from Piper Guineense (Fam.Piperaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceuticae Sciences*, 5(1).
- Lamm, M. E., Song, L., Wang, Z., Rahman, M. A., Lamm, B., Fu, L., & Tang, C. (2019). Tuning Mechanical Properties of Biobased Polymers by Supramolecular Chain Entanglement. *Macromolecules*, 52(22), 8967–8975. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b01828>
- Lee, I. C., He, J. S., Tsai, M. T., & Lin, K. C. (2015). Fabrication of a novel partially dissolving polymer microneedle patch for transdermal drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(2), 276–285. <https://doi.org/10.1039/c4tb01555j>
- Lelita, R., Gunawan, R., & Astuti, W. (2017). Studi Docking Molekular Senyawa Kuersetin, kalkon dan Turunannya sebagai inhibitor Sel Kanker Payudara MC-7 (Michigan Cancer Foundation-7). *Jurnal Atomik*, 1(2). www.pdb.org

- Lip, G. Y. H., Collet, J. P., Haude, M., Byrne, R., Chung, E. H., Fauchier, L., Halvorsen, S., Lau, D., Lopez-Cabanillas, N., Lettino, M., Marin, F., Obel, I., Rubboli, A., Storey, R. F., Valgimigli, M., Huber, K., Potpara, T., Lundqvist, C. B., Crijns, H., ... Jardine, R. (2019). 2018 Joint European consensus document on the management of antithrombotic therapy in atrial fibrillation patients presenting with acute coronary syndrome and/or undergoing percutaneous cardiovascular interventions: A joint consensus document of the Europ. *Europace*, *21*(2), 192–193. <https://doi.org/10.1093/europace/euy174>
- Liu, H., Beck, T. N., Golemis, E. A., & Serebriiskii, I. G. (2014). Integrating in silico resources to map a signaling network. *Methods in Molecular Biology*, *1101*, 197–245. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-721-1_11
- Liu, K., Zhao, F., Yan, J., Xia, Z., Jiang, D., & Ma, P. (2020). Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties. In *Life Sciences* (Vol. 259). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118395>
- Lopez, M., Kopec, A. K., Joshi, N., Geddings, J. E., Cline, H., Towery, K. L., Rockwell, C. E., Mackman, N., & Luyendyk, J. P. (2014a). Fas-induced apoptosis increases hepatocyte tissue factor procoagulant activity in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences*, *141*(2), 453–464. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu139>
- Lopez, M., Kopec, A. K., Joshi, N., Geddings, J. E., Cline, H., Towery, K. L., Rockwell, C. E., Mackman, N., & Luyendyk, J. P. (2014b). Fas-induced apoptosis increases hepatocyte tissue factor procoagulant activity in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences*, *141*(2), 453–464. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu139>
- Lutsey, P. L., & Zakai, N. A. (2023). Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 248–262). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00787-6>
- Mahfufah, U., Fitri Sultan, N. A., Nurul Fitri, A. M., Elim, D., Sya'ban Mahfud, M. A., Wafiah, N., Ardita Friandini, R., Chabib, L., Aliyah, & Permana, A. D. (2023). Application of multipolymers system in the development of hydrogel-forming microneedle integrated with polyethylene glycol reservoir for transdermal delivery of albendazole. *European Polymer Journal*, *183*. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111762>
- Mentari, I. A., Wirnawati, W., & Putri, M. R. (2020). Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) sebagai Kandidat Obat Karies Gigi. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, *5*(1), 1–9. <https://doi.org/10.36387/jiis.v5i1.346>
- Migues, V. H., David, J. M., & David, J. P. (2020). Determination of polyphenols in: *Schinus terebinthifolius* Raddi bark extracts and chemometric analysis. *Analytical Methods*, *12*(11), 1478–1485. <https://doi.org/10.1039/d0ay00197j>
- Milling, T. J., & Ziebell, C. M. (2020). Trends in Cardiovascular Medicine A review of oral anticoagulants , old and new , in major bleeding and the

- need for urgent surgery R. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 30(2), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.03.004>
- Młynarska, E., Hajdys, J., Czarnik, W., Fularski, P., Leszto, K., Majchrowicz, G., Lisińska, W., Rysz, J., & Franczyk, B. (2024). The Role of Antioxidants in the Therapy of Cardiovascular Diseases—A Literature Review. In *Nutrients* (Vol. 16, Issue 16). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu16162587>
- Mondong, F. R., Sangi, M. S., & Kumaunang, M. (2015). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb). *JURNAL MIPA UNSRAT ONLINE*, 4(1), 81–87.
- Mudjahid, M., Nainu, F., Utami, R. N., Sam, A., Marzaman, A. N. F., Roska, T. P., Asri, R. M., Himawan, A., Donnelly, R. F., & Permana, A. D. (2022). Enhancement in Site-Specific Delivery of Chloramphenicol Using Bacterially Sensitive Microparticle Loaded into Dissolving Microneedle: Potential for Enhanced Effectiveness Treatment of Cellulitis. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c16857>
- Mudjahid, M., Sulistiawati, Meidianto Asri, R., Nainu, F., & Dian Permana, A. (2023). Validation of spectrophotometric method to quantify chloramphenicol in fluid and rat skin tissue mimicking infection environment: Application to in vitro release and ex vivo dermatokinetic studies from dissolving microneedle loaded microparticle sensitive bacteria. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122374>
- Murakami, Y., Tripathi, L. P., Prathipati, P., & Mizuguchi, K. (2017). Network analysis and in silico prediction of protein–protein interactions with applications in drug discovery. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 44, pp. 134–142). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.02.005>
- Murciano, J. C., Muro, S., Koniaris, L., Christofidou-Solomidou, M., Harshaw, D. W., Albelda, S. M., Granger, D. N., Cines, D. B., & Muzykantov, V. R. (2003). ICAM-directed vascular immunotargeting of antithrombotic agents to the endothelial luminal surface. *Blood*, 101(10), 3977–3984. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2853>
- Muro, S., & Muzykantov, V. R. (2005). Targeting of Antioxidant and Anti-Thrombotic Drugs to Endothelial Cell Adhesion Molecules. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 11).
- Murphy, S. L., Kockanek, K. D., Arias, E., & Xu, J. (2020). Mortality in the United States, 2018. *NCHS Data Brief*, 355, 1–8.
- Muthukumarasamy, R., Kamaruddin, A. F., & Radhakrishnan, S. (2018). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant activity from *Citrus hystrix* peels. *Drug Invention Today*, 10(8), 1458–1462.

- Mutmainnah, P. A., Hakim, A., Rudyat, L., & Savalas, T. (2017). Identifikasi Senyawa Turunan Hasil Fraksinasi Kayu Akar *Artocarpus odoratissimus*. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA (JPPIPA)*, 3(2), 26–32.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret ftr spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97–118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>
- Ning, X., Wiraja, C., Chew, W. T. S., Fan, C., & Xu, C. (2021). Transdermal delivery of Chinese herbal medicine extract using dissolvable microneedles for hypertrophic scar treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(9), 2937–2944. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.016>
- Nonke, E., Kaunang, S., & Samuel, M. Y. (2017). Botanical and phytochemical constituents of several medicinal plants from mount Klabat north Minahasa. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(2), 29–35. <http://www.plantsjournal.com/archives/2017/vol5issue2/PartA/5-1-68-348.pdf>
- Nur, S., Sami, F. J., Awaluddin, A., & Afsari, M. I. A. (2019). Korelasi Antara Kadar Total Flavonoid dan Fenolik dari Ekstrak dan Fraksi Daun Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb.) Terhadap Aktivitas Antioksidan. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(1), 33–42. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i1.12034>
- Nurhayati, E., Sukma, A. U., & Wahdaniah. (2018). JURNAL LABORATORIUM KHATULISTIWA Pengaruh Ekstrak Kulit Jeruk Bali (*Citrus maxime* Merr.) Sebagai Antikoagulan Dengan Metode Clotting Time (Lee and White). *Jurnal Laboratorium Kesehatan*, 2(1).
- Nurul Fitri, A. M., Elim, D., Sya'ban Mahfud, M. A., Fitri Sultan, N. A., Saputra, M. D., Afika, N., Friandini, R. A., Natsir Djide, N. J., & Permana, A. D. (2023). Polymeric hydrogel forming microneedle-mediated transdermal delivery of sildenafil citrate from direct-compressed tablet reservoir for potential improvement of pulmonary hypertension therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 631. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122549>
- O'Brien, K. A., Stojanovic-Terpo, A., Hay, N., & Du, X. (2011a). An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*, 118(15), 4215–4223. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323204>
- O'Brien, K. A., Stojanovic-Terpo, A., Hay, N., & Du, X. (2011b). An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*, 118(15), 4215–4223. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323204>
- Ohkura, N., Taniguchi, M., Oishi, K., Inoue, K., & Ohta, M. (2022). *Angelica keiskei* (Ashitaba) has potential as an antithrombotic health food. *Food Research*, 6(2), 18–24. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(2\).121](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(2).121)
- Paar, M., Rossmann, C., Nussold, C., Wagner, T., Schlagenhaut, A., Leschnik, B., Oettl, K., Koestenberger, M., Cvirn, G., & Hallström, S. (2017a).

- Anticoagulant action of low, physiologic, and high albumin levels in whole blood. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182997>
- Paar, M., Rossmann, C., Nussold, C., Wagner, T., Schlagenhauf, A., Leschnik, B., Oettl, K., Koestenberger, M., Cvirn, G., & Hallström, S. (2017b). Anticoagulant action of low, physiologic, and high albumin levels in whole blood. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182997>
- Pangalo, P., Sapiun, Z., Imran, A. K., Muindar, Sabaruddin, Wicita, P. S., Ysrafil, & Mohamad, F. (2022). Optimization of Dimethyl Sulfoxide as an Enhancer on Ex Vivo Penetration of Sesewanua (*Clerodendrum fragrans* WILD.) Leaf Extracts Emulgel (In Press). *International Journal of Applied Pharmaceutics*, May.
- Parrilla, M., Vanhooydonck, A., Johns, M., Watts, R., & De Wael, K. (2023). 3D-printed microneedle-based potentiometric sensor for pH monitoring in skin interstitial fluid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.133159>
- Perumal, R. K., Perumal, S., Thangam, R., Gopinath, A., Ramadass, S. K., Madhan, B., & Sivasubramanian, S. (2018). Collagen-fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast proliferation for regenerative applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1032–1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.111>
- Putri, A. P. D., Ilyas, N. R. A., Abdullah, D. A. P., Pratama, F. A., Azzahra, K. S., & Permana, A. D. (2024). Development and validation of UV–Vis spectrophotometric method for determination of rivastigmine in PBS and biological matrices: Application to ex vivo permeation profiles and in vivo studies from trilayer dissolving microneedle. *Chemical Data Collections*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2023.101106>
- Putri, H. E., Utami, R. N., Aliyah, Wahyudin, E., Oktaviani, W. W., Mudjahid, M., & Permana, A. D. (2022). Dissolving Microneedle Formulation of Ceftriaxone: Effect of Polymer Concentrations on Characterisation and Ex Vivo Permeation Study. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 17(4), 1176–1188. <https://doi.org/10.1007/s12247-021-09593-y>
- Rababa'h, A. M., Al Yacoub, O. N., El-Elimat, T., Rabab'ah, M., Altarabsheh, S., Deo, S., Al-Azayzih, A., Zayed, A., Alazzam, S., & Alzoubi, K. H. (2020). The effect of hawthorn flower and leaf extract (*Crataegus* Spp.) on cardiac hemostasis and oxidative parameters in Sprague Dawley rats. *Heliyon*, 6(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04617>
- Rahmadani, S., Sa'diah, S., & Wardatun, S. (2018). *Optimasi Ekstraksi Jahe Merah (Zingiber officinale Roscoe) dengan Metode Maserasi*.
- Rahman, L., Lembang, R. S., Lallo, S., Handayani, S. R., Usmanengsi, U., & Permana, A. D. (2021). Bioadhesive dermal patch as promising approach for improved antibacterial activity of bioactive compound of *Zingiber cassumunar* Roxb in ex vivo *Staphylococcus aureus* skin infection model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102522>

- Rahmawati, R. (2018). Potensi Antikoagulan Sari Bawang Putih (*Allium sativum*) Menggunakan Metode Lee-White dan Apusan darah. *Majalah Farmaseutik*, 14(1).
- Rahmawati Rahmawati, Muammar Fawwas, Rais Razak, & Utami Ismlamiati. (2018). Potensi Antikoagulan Sari Bawang Putih (*Allium sativum*) Menggunakan Metode Lee-White dan Apusan Darah. *Majalah Farmaseutik*, 14(1), 42–48.
- Requena, M. B., Permana, A. D., Vollet-Filho, J. D., González-Vázquez, P., Garcia, M. R., De Faria, C. M. G., Pratavieira, S., Donnelly, R. F., & Bagnato, V. S. (2021). Dissolving microneedles containing aminolevulinic acid improves protoporphyrin IX distribution. *Journal of Biophotonics*, 14(1). <https://doi.org/10.1002/jbio.202000128>
- Runtuwene, K. N., Yamlean, P. V. Y., & Yudistira, A. (2019). Formulation, Stability Test and Antioxidant Effectiveness Test of Gel Preparations from Ethanol Extract of Sesewanua Leaves (*Clerodendron squamatum* Vahl) Using the DPPH Method. *Pharmacon*.
- Sa'adah, H., & Nurhasnawati, H. (2015). Comparison of Ethanol and Water Solvents in the Preparation of Tiwai Onion (*Eleutherine americana* Merr) Extract Using the Maceration Method. *Jurnal Ilmiah Manuntung*.
- Sabar, J., Fatimah, F., & Rorong, J. A. (2015). Karakterisasi Minyak Ikan dari Pemurnian Limbah Ikan Tuna dengan Zeolit secara Kromatografi Kolom. *Jurnal Mipa Unsrat*, 4(2), 161–164. <https://doi.org/10.1007/bf01707008>
- Saha, K. C., Seal, H. P., & Noor, M. A. (2013). Isolation and characterization of piperine from the fruits of black pepper (*Piper nigrum*). *J. Bangladesh Agril. Univ*, 11(1), 11–16. <http://ageconsearch.umn.edu>
- Salehi, B., Machin, L., Monzote, L., Sharifi-Rad, J., Ezzat, S. M., Salem, M. A., Merghany, R. M., El Mahdy, N. M., Killç, C. S., Sytar, O., Sharifi-Rad, M., Sharopov, F., Martins, N., Martorell, M., & Cho, W. C. (2020). Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*, 5(20), 11849–11872. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>
- Sapiun, Z., Imran, A. K., Teresia, S., Dewi, R., Masita, D. F., Ibrahim, W., Tungadi, R., Abdulkadir, W. S., Banne, Y. O. S., Sartini, S., Permana, A. D., Rifai, Y., Ysrafil, Y., & Sulastri, N. (2023). Formulation and Characterization of Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System (SNEEDS) Fraction of n-Hexane:Ethyl Acetate from Sesewanua (*Clerodendrum fragrans* Wild.). *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 15(2). <https://doi.org/10.22159/ijap.2023v15i2.46365>
- Sapiun, Z., Lasori, S. R., Imran, A. K., Rifai, Y., Subehan, Permana, A. D., & Nainu, F. (2022). Thin Layer Chromatography Profile and Antioxidant Activity of n- Hexan:Ethyl Acetate Fraction of Ethanol Extract of Sesewanua Leaves (*Clerodendrum fragrans* Wild.). *ICOS*, May, 75.

- Sapiun, Z., Pangalo, P., Endarti, D., Banne, Y., Wicita, P. S., Imran, A. K., & Mohama, F. (2020). Cytotoxic Activity of Sesewanua (*Clerodendrum fragrans* Wild) Leaf Ethanol Extract on Breast Cancer Cell. In M. Kes. Drs. Edy Haryanto, M. Kes. Pestariati, S.Pd, M. K. Evy DiahWulansari, S.Si., M. Kes. Suhariyadi, S.Pd., MT. Ferry Kriswandana, S.ST, M. Si. Marlik, & M. K. Narwati (Eds.), *Proceeding 1 st International Conference on Clinical Laboratory and Environmental Health (ICOCLEH)* (p. 24). Health Polytechnic of the Ministry of Health, Surabaya.
- Sapiun, Z., Pangalo, P., Imran, A. K., Wicita, P. S., & Daud, R. P. A. (2020). Determination of total flavonoid levels of ethanol extract Sesewanua leaf (*Clerodendrum fragrans* Wild) with maceration method using UV-vis spectrophotometry. *Pharmacognosy Journal*, *12*(2), 356–360. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.56>
- Sari, A. P., Amanah, N. L., Wardatullathifa, A., & Nugroho, A. (2022). Comparison of Maseration and Sonication Method on Flavonoid Extraction from Mango Leaves: Effect of Solvent Ratio. *ASEAN Journal of Chemical Engineering*, *22*(2), 274–283. <https://doi.org/10.22146/ajche.74204>
- Senduk, T. W., Montolalu, L. A. D. Y., & Dotulong, V. (2020). Rendemen Ekstrak Air Rebusan Daun Tua Mangrove *Sonneratia alba*. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan Tropis*, *11*. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/JPKT/index>
- Seo, J. E., Kim, S., & Kim, B. H. (2017). In vitro skin absorption tests of three types of parabens using a Franz diffusion cell. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, *27*(3), 320–325. <https://doi.org/10.1038/jes.2016.33>
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Antioxidant Activity Test of Secang Wood (*Caesalpinia sappan*) Ethanol Extract Using DPPH, ABTS, and. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, *2*(2), 82–89.
- Shim, W. S., Hwang, Y. M., Park, S. G., Lee, C. K., & Kang, N. G. (2018). Role of Polyvinylpyrrolidone in Dissolving Microneedle for Efficient Transdermal Drug Delivery: In vitro and Clinical Studies. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *39*(6), 789–793. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11476>
- Simbala, H. (2007). *Floristic Diversity and Its Use as Medicinal Plants in Conservation Area II Bogani Nani Wartabone National Park (Bolaang Mongondow Regency, North Sulawesi)*.
- Sławińska, N., Kluska, M., Moniuszko-Szajwaj, B., Stochmal, A., Woźniak, K., & Olas, B. (2023). New Aspect of Composition and Biological Properties of *Glechoma hederacea* L. Herb: Detailed Phytochemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Anticoagulant Activity and Toxicity in Selected Human Cells and Plasma In Vitro. *Nutrients*, *15*(7). <https://doi.org/10.3390/nu15071671>
- Srivastava, N., Mishra, S., Iqbal, H., Chanda, D., & Shanker, K. (2021). Standardization of *Kaempferia galanga* L. rhizome and vasorelaxation

- effect of its key metabolite ethyl p-methoxycinnamate. *Journal of Ethnopharmacology*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113911>
- Sulastri, L., Oktavia, I., & Simanjuntak, P. (2020). Aktivitas Antioksidan Kecibeling, Bakau Merah, dan Katuk pada Maserasi Ekstraksi dan Rasio Ekstrak yang Berbeda. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat*, 31(1), 1. <https://doi.org/10.21082/bullitro.v31n1.2020.1-7>
- Sulistiawati, Saka Dwipayanti, K., Azhar, M., Rahman, L., Pakki, E., Himawan, A., & Permana, A. D. (2022). Enhanced skin localization of metronidazole using solid lipid microparticles incorporated into polymeric hydrogels for potential improved of rosacea treatment: An ex vivo proof of concept investigation. *International Journal of Pharmaceutics*, 628. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122327>
- Syafika, N., Azis, S. B. A., Enggi, C. K., Qonita, H. A., Mahmud, T. R. A., Abizart, A., Asri, R. M., & Permana, A. D. (2023). Glucose-Responsive Microparticle-Loaded Dissolving Microneedles for Selective Delivery of Metformin: A Proof-of-Concept Study. *Molecular Pharmaceutics*, 20(2), 1269–1284. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00936>
- Tentu, N., Ijaz, A., Batool, S., Khan, R. S., Mohammed, F., Khan, M. H., Sandhu, Q. I., & Ali, N. (2022). Comparison of Efficacy and Safety of Anticoagulant Monotherapy and Combined Therapy of Anticoagulant and Antiplatelets in Patients With Stable Coronary Artery Disease and Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis. *Cureus*, 14(9). <https://doi.org/10.7759/cureus.29772>
- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2019). Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 1, pp. 109–131). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008>
- Urrutia, T. C., Guzmán, L., Hirschmann, G. S., Carrasco, R., Alarcón, M., Astudillo, L., Gutierrez, M., Carrasco, G., Yuri, J. A., Aranda, E., & Palomo, I. (2011). Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic activity in vitro of extracts from selected fruits and vegetables. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 22(3), 197–205. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e328343f7da>
- Vazquez, P. G., Larrañeta, E., McCrudden, M. T. C., Jarrahan, C., Rein-Weston, A., Quintanar-Solares, M., Zehrun, D., McCarthy, H., Courtenay, A. J., & Donnelly, R. F. (2017). Transdermal delivery of gentamicin using dissolving microneedle arrays for potential treatment of neonatal sepsis. *Journal of Controlled Release*, 265, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.032>
- Wahba, H. M., Abouzid, S. F., Sleem, A. A., Apers, S., Pieters, L., & Shahat, A. A. (2011). Chemical and biological investigation of some Clerodendrum species cultivated in Egypt. *Pharmaceutical Biology*, 49(1), 66–72. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.494674>
- Wahyu, A., & Ningrat, S. (2022). Docking Molekuler Senyawa Brazilein Herba Caesalpina Sappanis Lignum Pada Mycobacterium Tuberculosis Inha

- Sebagai Antituberkulosis. *Indonesian Helath Journal (Inhealth)*, 1. www.pdb.org
- Wang, Q. L., Ren, J. W., Chen, B. Z., Jin, X., Zhang, C. Y., & Guo, X. D. (2018). Effect of humidity on mechanical properties of dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 59, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.10.030>
- Wilson, T. D., & Steck, W. F. (2000). A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 867–872. www.elsevier.com/locate/foodchemtox
- World Health Organization. (2024). *Cardiovascular Disease (CVDs)*. [who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Yamada, K., Naemura, A., Sawashita, N., Noguchi, Y., & Yamamoto, J. (2004). An onion variety has natural antithrombotic effect as assessed by thrombosis/thrombolysis models in rodents. *Thrombosis Research*, 114(3), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.007>
- Yang, J., Wang, X., Wu, D., Yi, K., & Zhao, Y. (2023). Yunnan Baiyao-loaded multifunctional microneedle patches for rapid hemostasis and cutaneous wound healing. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01936-w>
- Ysrafil, Y., Sapiun, Z., Slamet, N. S., Mohamad, F., Hartati, H., Damiti, S. A., Alexandra, F. D., Rahman, S., Masyeni, S., Harapan, H., Mamada, S. S., Bin Emran, T., Nainu, F., Kesehatan, K. K., & Raya, P. (2023). Anti-inflammatory activities of flavonoid derivatives. *ADMET & DMPK*, 11(3). <https://doi.org/10.5599/adme>
- Zhang, Y., Ying, D., Liu, H., Yu, Z., Han, L., Xie, J., & Xie, Y. (2017). Serum pharmacokinetics and coagulation aberration induced by sodium dehydroacetate in male and female Wistar rats. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep46210>
- Zhao, W., Zheng, L., Yang, J., Ma, Z., Tao, X., & Wang, Q. (2023). Dissolving microneedle patch-assisted transdermal delivery of methotrexate improve the therapeutic efficacy of rheumatoid arthritis. *Drug Delivery*, 30(1), 121–132. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2157518>
- Zhao, X., Dong, S., Wang, J., Li, F., Chen, A., & Li, B. (2012). A comparative study of antithrombotic and antiplatelet activities of different fucoidans from *Laminaria japonica*. *Thrombosis Research*, 129(6), 771–778. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.07.041>
- Zheng, J., & Zhou, W. (2018). In vitro toxicity test of nano-sized magnesium oxide synthesized via solid-phase transformation. *AIP Conference Proceedings*, 1955. <https://doi.org/10.1063/1.5033589>
- Zhou, H. Y., Zhang, Y. P., Zhang, W. F., & Chen, X. G. (2011). Biocompatibility and characteristics of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel

for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1643–1651.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.022>

Zubair, M. S., Maulana, S., & Mukaddas, A. (2020). Penambatan Molekuler dan Simulasi Dinamika Molekuler Senyawa Dari Genus *Nigella* Terhadap Penghambatan Aktivitas Enzim Protease HIV-1. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(1), 132–140.
<https://doi.org/10.22487/j24428744.2020.v6.i1.14982>