Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Terhadap Aterosklerosis Melalui Jalur MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dengan Metode *Molecular Docking* dan Uji DPPH (*1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil*)

SKRIPSI

Oleh:

AYUNDA NOVITA SARI

2108260220

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

MEDAN

2025

Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Terhadap Aterosklerosis Melalui Jalur MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dengan Metode *Molecular Docking* dan Uji DPPH (*1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil*)

Skripsi ini Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Kelulusan Sarjana Kedokteran

Oleh:

AYUNDA NOVITA SARI

2108260220

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

MEDAN

2025

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext. 20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu@ac.id

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Ayunda Novita Sari

NPM : 2108260220

Judul : Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) terhadap Aterosklerosis melalui Jalur MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dengan Metode *Molecular Docking* dan Uji DPPH (1,1-*Difenil-2-pikrilhidrazil*)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk

memperoleh gelar Sarjana kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

DEWAN PENGUJI

Pembimbing,

(dr. Yenita, M.Biomed, Sp.KKLP)

Penguji 1

(Dr. Emni Purwoningsih, S.Pd., M.Kes,)

Penguji 2

(dr. Fani Ade Irma, M.Ked (ClinPath),)

Mengetahui,

Dekan FK UMSU
Pendidikan Dokter FK UMSU

(dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL., Subsp.Rino(K),)
NIDN: 0106098201

Ketua Program Studi

(dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked)
NIDN: 0112098605

Ditetapkan di: Medan
Tanggal : 7 januari 2026

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ayunda Novita Sari
NPM 2108260220
Judul Skripsi : Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) terhadap Aterosklerosis melalui Jalur MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dengan Metode *Molecular Docking* dan Uji DPPH (1,1-*Difenil*-2-*pikrilhidrazil*)

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Medan, 29 Desember 2025



(Ayunda Novita Sari)

KATA PENGANTAR

Wasalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala atas segala rahmat, nikmat, karunia, serta pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **"Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) terhadap Aterosklerosis melalui Jalur MMP (Matrix Metalloproteinase) dengan Metode Molecular Docking dan Uji DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil)"** dengan baik.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan berkat dukungan, arahan, bimbingan, motivasi, doa, serta berbagai bentuk bantuan yang diberikan oleh banyak pihak. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, Ayahanda Nano dan Ibunda Setia Wati, yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, dukungan moral maupun material, serta pengorbanan yang tidak ternilai. Ketulusan, kesabaran, dan keikhlasan Ayah dan Ibu dalam mendidik serta mendampingi penulis menjadi sumber kekuatan untuk terus bertahan dan menyelesaikan pendidikan hingga tahap akhir. Setiap pencapaian yang diraih penulis merupakan buah dari doa, pengorbanan, dan cinta kasih yang selalu diberikan tanpa henti.
2. dr. Yenita, M.Biomed., Sp.KKLP, selaku dosen pembimbing skripsi, yang dengan penuh kesabaran, ketulusan, dan dedikasi telah memberikan arahan, bimbingan, serta berbagai masukan yang sangat berharga selama proses penyusunan skripsi ini. Ilmu, perhatian, dan motivasi yang beliau berikan menjadi bekal penting bagi penulis untuk terus berkembang, baik dalam bidang akademik maupun penelitian.
3. dr. Emni Purwoningsih, S.Pd., M.Kes, selaku dosen penguji I, yang telah memberikan kritik, saran, serta masukan yang konstruktif selama proses

ujian dan penyempurnaan skripsi. Berbagai pandangan dan arahan beliau memberikan kontribusi besar dalam meningkatkan kualitas penelitian ini.

4. dr. Fani Ade Irma, M.Ked. (ClinPath), selaku dosen penguji II, atas perhatian, bimbingan, serta berbagai masukan yang diberikan selama pelaksanaan ujian skripsi. Saran dan perspektif yang beliau sampaikan menjadi bahan evaluasi yang sangat bermanfaat sehingga penelitian ini dapat disempurnakan dengan lebih baik.
5. dr. Cut Mourisa, M.Biomed, selaku dosen pembimbing akademik, yang selama masa perkuliahan senantiasa memberikan arahan, dukungan, motivasi, dan doa kepada penulis. Bimbingan beliau menjadi penyemangat bagi penulis dalam menjalani seluruh proses pendidikan hingga penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan.
6. Indyra Maharani, S.Ked. dan Dimas Fujiansyah, S.Ked., yang telah memberikan doa, dukungan, perhatian, serta semangat selama perjalanan penyusunan skripsi ini. Kehadiran kalian tidak hanya sebagai rekan seperjuangan, tetapi juga sebagai sahabat yang selalu bersedia mendengarkan, memberikan motivasi, dan menemani penulis melewati berbagai tantangan selama proses perkuliahan.
7. Kepada IPDA Pareyan Raja Shahad, S.Tr.I.K., penulis mengucapkan terima kasih atas segala pengalaman, pembelajaran, dan kebersamaan yang pernah menjadi bagian dari perjalanan hidup penulis. Berbagai kenangan yang telah dilalui memberikan pelajaran berharga, membentuk kedewasaan, serta mengajarkan arti kesabaran dan keteguhan dalam menghadapi setiap proses kehidupan. Walaupun perjalanan telah membawa masing-masing pada arah yang berbeda, penulis tetap mensyukuri setiap pengalaman yang pernah dilalui.
8. Salsabila Hasibuan beserta seluruh sahabat dan rekan-rekan yang tidak dapat disebutkan satu per satu, penulis menyampaikan rasa terima kasih atas doa, dukungan, kebersamaan, serta ketulusan yang selalu diberikan selama masa perkuliahan. Kehadiran kalian telah menghadirkan semangat, kebahagiaan, dan berbagai kenangan indah yang membuat setiap proses terasa lebih ringan. Semoga tali persahabatan ini tetap terjalin dengan baik

dan Allah Subhanahu wa Ta'ala senantiasa mempertemukan kita kembali dalam keberkahan dan kebaikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki berbagai keterbatasan dan belum sepenuhnya sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan demi penyempurnaan karya ilmiah ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat, baik sebagai tambahan ilmu pengetahuan maupun sebagai referensi bagi penelitian selanjutnya, khususnya di bidang kedokteran dan ilmu kesehatan.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Medan,

Penulis

Ayunda Novita Sari

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ayunda Novita Sari

NPM 2108260220

Fakultas : Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas karya tulis ilmiah saya yang berjudul :

"**Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) terhadap Aterosklerosis melalui Jalur MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dengan Metode *Molecular Docking* dan Uji DPPH (1,1-*Difenil*-2-*pikrilhidrazil*)**" beserta perangkat yang ada (jika diperlukan).

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalih media atau formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan

Pada tanggal : 29 Desember 2025

Yang menyatakan

(Ayunda Novita Sari)

ABSTRAK

Pendahuluan: Aterosklerosis merupakan penyebab utama penyakit kardiovaskular. Matrix metalloproteinases (MMPs), khususnya MMP-2 dan MMP-9, berperan penting dalam degradasi matriks ekstraseluler pada patogenesis aterosklerosis. Tokotrienol dari minyak kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) memiliki potensi sebagai antioksidan dan inhibitor MMP. Menganalisis aktivitas antioksidan tokotrienol minyak sawit dengan metode DPPH dan mengkaji interaksi molekulernya terhadap MMP-2 dan MMP-9 melalui molecular docking. **Metode:** Ekstraksi tokotrienol dilakukan dari mesokarp kelapa sawit menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH pada konsentrasi 150, 300, 450, dan 600 ppm dengan asam askorbat sebagai kontrol positif. Analisis molecular docking menggunakan AutoDock Vina terhadap struktur protein MMP-2 (PDB ID: 1HOV) dan MMP-9 (PDB ID: 1GKC) dengan validasi metode re-docking (RMSD < 2 Å). **Hasil:** Uji DPPH menunjukkan interferensi pengukuran akibat kompleksitas matriks CPO dengan persentase inhibisi bervariasi. Hasil molecular docking menunjukkan tokotrienol memiliki afinitas pengikatan kuat terhadap MMP-9 dengan binding energy -12,88 kkal/mol, lebih tinggi dibandingkan ligan alami (-11,12 kkal/mol). Tokotrienol berinteraksi dengan residu kunci LEU-188, HIS-226, dan TYR-248 melalui ikatan hidrogen, hidrofobik, dan pi-stacked. **Kesimpulan:** Tokotrienol minyak sawit menunjukkan potensi sebagai inhibitor MMP-9 yang dapat menghambat degradasi matriks ekstraseluler dan akumulasi makrofag, berpotensi sebagai kandidat terapi preventif aterosklerosis.

Kata kunci: tokotrienol, minyak sawit, aterosklerosis, MMP-9, molecular docking, DPPH

ABSTRACT

Background: *Atherosclerosis is the leading cause of cardiovascular disease. Matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-2 and MMP-9, play crucial roles in extracellular matrix degradation during atherosclerosis pathogenesis. Tocotrienols from palm oil (Elaeis guineensis Jacq.) demonstrate potential as antioxidants and MMP inhibitors.To analyze the antioxidant activity of palm oil tocotrienol using DPPH method and evaluate its molecular interactions with MMP-2 and MMP-9 through molecular docking.* ***Methods:*** *Tocotrienol was extracted from palm mesocarp using maceration method with methanol solvent. Antioxidant activity was assessed using DPPH method at concentrations of 150, 300, 450, and 600 ppm with ascorbic acid as positive control. Molecular docking analysis was performed using AutoDock Vina against MMP-2 (PDB ID: 1HOV) and MMP-9 (PDB ID: 1GKC) protein structures with re-docking validation (RMSD < 2 Å).* ***Results:*** *DPPH assay showed measurement interference due to CPO matrix complexity with variable inhibition percentages. Molecular docking revealed tocotrienol exhibited strong binding affinity to MMP-9 with binding energy of -12.88 kcal/mol, superior to native ligand (-11.12 kcal/mol). Tocotrienol interacted with key residues LEU-188, HIS-226, and TYR-248 through hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and pi-stacked interactions.* ***Conclusion:*** *Palm oil tocotrienol demonstrates potential as an MMP-9 inhibitor capable of suppressing extracellular matrix degradation and macrophage accumulation, positioning it as a promising preventive therapy candidate for atherosclerosis.*

Keywords*: tocotrienol, palm oil, atherosclerosis, MMP-9, molecular docking, DPPH*

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS ii
LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING iii
KATA PENGANTAR iv
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS viii
ABSTRAK ix
ABSTRACT **..... x**
DAFTAR ISI ix
DAFTAR GAMBAR xiii
DAFTAR TABEL xiv
BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 LATAR BELAKANG 1
1.2 RUMUSAN MASALAH 5
1.3 TUJUAN PENELITIAN 5
1.3.1 Tujuan Umum 5
1.3.2 Tujuan Khusus 6
1.4 MANFAAT PENELITIAN 6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 8
2.1 Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) 8
2.1.1 Taksonomi dan Klasifikasi Kelapa Sawit 8
2.1.2 Morfologi dan Karakteristik Botani 9
2.1.3 Distribusi Geografis dan Produksi Global 9
2.1.4 Genus *Elaeis* dan Spesies Terkait 9
2.2 Minyak Sawit dan Komposisi Kimia 10
2.2.1 Jenis Minyak dari Kelapa Sawit 10
2.2.4 Komposisi Asam Lemak 10
2.3 Tokotrienol: Vitamin E dari Minyak Sawit 11
2.3.1 Struktur dan Klasifikasi Vitamin E 11
2.3.2 Tokotrienol dalam Minyak Sawit 11
2.3.3 Aktivitas Antioksidan Tokotrienol 12
2.3.4 Bioaktivitas Tokotrienol dalam Kesehatan Kardiovaskular 12
2.4 Aterosklerosis 13
2.4.1 Definisi dan Epidemiologi Aterosklerosis 13

2.4.2 Patofisiologi Aterosklerosis.....14
2.4.3 Peran Stres Oksidatif dan Inflamasi 15
2.5 *Matrix Metalloproteinase* (MMP).....16
2.5.1 Struktur dan Klasifikasi MMP 16
2.5.2 *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) 16
2.5.3 Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9).....17
2.5.4 Regulasi MMP oleh *TIMP* 18
2.5.5 MMP sebagai Target Terapeutik 19
2.6 Metode Uji DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 19
2.6.1 Prinsip Metode DPPH.....19
2.6.2 Keunggulan dan Keterbatasan Metode DPPH.....20
2.6.3 Parameter IC_{50} dalam Uji DPPH.....20
2.6.4 Prinsip Molecular Docking 20
2.6.5 Tahapan Molecular docking..... 2
2.6.6 Software Molecular Docking 21
2.6.7 Validasi Metode *Docking*.....22
2.7 Farmakokinetik dan Toksikologi Tokotrienol 23
2.7.1 Absorpsi Tokotrienol 23
2.7.2 Distribusi Tokotrienol 24
2.7.3 Metabolisme Tokotrienol 25
2.7.4 Ekskresi Tokotrienol 27
2.7.5 Toksikologi dan Keamanan Tokotrienol 28
2.8 Kerangka Teori 32
2.9 Kerangka Konsep.....33
2.10 Hipotesis 34
BAB 3 METODE PENELITIAN 35
3.1 Defenisi Operasional.....35
3.2 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....41
3.3 Waktu dan tempat penelitian.....40
3.3.1 Waktu Penelitian.....40
3.3.2 Tempat Penelitian.....40
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian 40
3.4.1 Populasi Penelitian.....40
3.4.2 Sampel Penelitian.....42
3.5 Alat dan Bahan yang digunakan.....43

3.5.1 Alat-alat yang digunakan 43
3.5.2 Bahan-bahan yang digunakan.....43
3.6 Teknik Pengumpulan Data.....44
3.6.1 Pengambilan sampel 44
3.6.2 Pengolahan sampel.....44
3.6.3 Ekstraksi Sampel.....44
3.6.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH 45
3.6.5 Uji Molecular Docking 47
3.7 Pengolahan dan Analisis Data.....54
3.7.1 Pengolahan Data 54
3.7.2 Analisis Data.....55
3.7 Alur Penelitian.....56
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN 57
4.1. Hasil Penelitian.....57
4.1.1. Hasil Ekstraksi CPO (*Crude Palm Oil*).....57
4.1.2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan CPO Metode DPPH.....57
4.1.3. Validasi Metode *Molecular Docking*.....59
4.1.4. Prediksi Ikatan Afinitas Tokotrienol terhadap Struktur MMP 61
4.1.5. Analisis Interaksi Molekuler Tokotrienol dengan MMP-9.....63
4.1.6. Prediksi Mekanisme Anti-Aterosklerosis Tokotrienol.....66
4.2. Pembahasan 67
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....74
5.1. Kesimpulan.....74
5.2. Saran.....74
DAFTAR PUSTAKA 76
LAMPIRAN 87

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 . Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq..... 8
Gambar 2.2 Kerangka Teori 32
Gambar 2.3 Kerangka Konsep..... 33
Gambar 4.1 Visualisasi validasi docking ligan alami struktur protein (A) 60
Gambar 4.2. Visualisasi docking antara tokotrienol dengan MMP-9 (A) . 65

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Defenisi Operasional 35
Tabel 3.2 Waktu Penelitian 41
Tabel 3.3 Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Tokotrienol 46
Tabel 3.4 Pembuatan Larutan Seri Kontrol Positif (Vitamin C) 45
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Absorbansi CPO dengan Metode DPPH 56
Tabel 4.2 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Kontrol Positif 57
(Asam Askorbat) dengan Metode DPPH
Tabel 4.3 Prediksi ikatan afinitas tokotrienol terhadap beberapa jenis
struktur MMP yang berpotensi terlibat dalam proses
aterosklerosis 60

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Penyakit kardiovaskular hingga saat ini masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia. Sebagian besar kasus penyakit tersebut dipicu oleh aterosklerosis sebagai proses patologis yang mendasarinya. Organisasi kesehatan dunia melaporkan bahwa setiap tahun lebih dari 17,9 juta orang meninggal akibat penyakit kardiovaskular, atau sekitar 31% dari seluruh angka kematian global. Di Indonesia, perubahan pola penyakit dari penyakit infeksi menuju penyakit tidak menular menyebabkan penyakit kardiovaskular menjadi penyebab kematian yang semakin dominan. Data *Global Burden of Disease* (GBD) tahun 2019 menunjukkan bahwa jumlah kematian akibat penyakit kardiovaskular meningkat tajam, dari sekitar 292.000 kasus pada tahun 1990 menjadi sekitar 659.000 kasus pada tahun 2019, sehingga Indonesia menempati urutan keenam sebagai negara dengan angka kematian kardiovaskular tertinggi di dunia. Selain itu, hasil Riskesdas 2018 memperlihatkan tingginya prevalensi faktor risiko seperti merokok, kurang aktivitas fisik, obesitas, dan hipertensi dengan kisaran 28–33%. Penelitian SMARThealth Extend di Malang juga melaporkan bahwa hampir sepertiga penduduk berusia ≥40 tahun termasuk kelompok berisiko tinggi mengalami penyakit kardiovaskular, namun hanya sebagian kecil yang memperoleh terapi antihipertensi maupun statin. Kondisi serupa juga ditemukan di Provinsi Sumatera Utara. Berdasarkan diagnosis dokter, prevalensi penyakit jantung koroner mencapai 1,5% pada tahun 2018, sedangkan pada tahun 2023 tercatat lebih dari 9.000 kasus gangguan jantung. Di Kota Medan, RSUP Haji Adam Malik melaporkan 232 kasus sindrom koroner akut dengan hipertensi sebagai faktor risiko yang paling banyak dijumpai. Data tersebut menunjukkan perlunya upaya pencegahan dan pengembangan terapi yang lebih efektif untuk menekan angka kejadian penyakit kardiovaskular.[5]

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang berkembang secara progresif akibat interaksi berbagai mekanisme biologis, meliputi disfungsi endotel, akumulasi lipid, respons inflamasi, serta perubahan struktur dinding

pembuluh darah.[5] Proses aterogenesis diinisiasi oleh kerusakan endotel akibat stres oksidatif, yang memicu peningkatan permeabilitas vaskular dan akumulasi *low-density lipoprotein* (LDL) teroksidasi di ruang subendotelial.

Oksidasi LDL menginduksi ekspresi molekul adhesi seperti *vascular celladhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), memfasilitasi rekrutmen monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag dan membentuk *foam cells* melalui uptake kolesterol berlebihan.[6] Progresi lesi aterosklerotik melibatkan proliferasi sel otot polos vaskular, deposisi matriks ekstraseluler, dan pembentukan inti nekrotik yang dienkapsulasi oleh *fibrous cap*, di mana destabilisasi plak melalui degradasi matriks oleh enzim proteolitik menjadi determinan kritis terjadinya sindrom koroner akut.[7]

Indonesia sebagai produsen kelapa sawit terbesar dunia dengan kontribusi 59% produksi global atau 48,3 juta ton pada tahun 2023, memiliki keunggulan komparatif dalam eksplorasi bioaktif turunan kelapa sawit untuk aplikasi kesehatan. Minyak buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mengandung spektrum senyawa bioaktif yang unik, termasuk tokotrienol (70% dari total vitamin E), karotenoid (500-700 ppm), fitosterol (300-600 ppm), dan squalene (200-500 ppm), yang secara sinergis berkontribusi terhadap aktivitas kardioprotektif. [8] Fraksi minor minyak kelapa sawit kaya akan antioksidan lipofilik yang telah terbukti secara klinis menurunkan biomarker inflamasi dan stres oksidatif, dengan studi pada manusia menunjukkan penurunan *C-reactive protein* sebesar 23% dan *malondialdehid* sebesar 18% setelah suplementasi 8 minggu.[9] Keunggulan minyak kelapa sawit dibandingkan sumber vitamin E lainnya terletak pada rasio tokotrienol:tokoferol yang tinggi (3:1) dan bioavailabilitas superior akibat komposisi asam lemak yang optimal untuk absorpsi intestinal.[10]

Tokotrienol merupakan analog vitamin E dengan struktur kromanil yang memiliki rantai samping farnesil tak jenuh, memberikan mobilitas membran superior dan aktivitas antioksidan 40-60 kali lebih poten dibandingkan α-tokoferol.[11] Keempat isomer tokotrienol (α-, β-, γ-, dan δ-) menunjukkan aktivitas biologis diferensial, dengan δ-tokotrienol memiliki potensi tertinggi dalam menghambat *HMG-CoA reductase* (IC50 = 0,18 μM) dan menginduksi degradasi proteasomal enzim tersebut melalui mekanisme post-translasional.[12] Meta-analisis

dari 18 *randomized controlled trials* melaporkan bahwa suplementasi tokotrienol (median dosis 200 mg/hari) secara signifikan menurunkan kolesterol total sebesar 9,8%, LDL-kolesterol 12,2%, dan trigliserida 15,1%, serta meningkatkan HDL-kolesterol sebesar 4,5%.[13] Mekanisme antiaterogenik tokotrienol melibatkan: (1) inhibisi biosintesis kolesterol melalui supresi *HMG-CoA reductase*, (2) modulasi ekspresi gen melalui aktivasi *PPARα/γ*, (3) penekanan jalur NF-κB dan produksi sitokin proinflamasi, (4) upregulasi enzim antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* dan *glutathione peroxidase*, serta (5) preservasi fungsi endotel melalui peningkatan bioavailabilitas *nitric oxide*. [14]

Salah satu molekul yang berperan penting dalam perkembangan aterosklerosis adalah *Matrix Metalloproteinase* (MMP), yaitu kelompok enzim endopeptidase yang bergantung pada ion seng (zinc-dependent endopeptidase) dan berfungsi dalam proses degradasi matriks ekstraseluler.[15] Aktivitas MMP yang berlebihan, khususnya MMP-2, MMP-9, dan MMP-14, berhubungan erat dengan terbentuknya plak aterosklerotik yang tidak stabil. Peningkatan ekspresi enzim tersebut menyebabkan penipisan *fibrous cap*, pembesaran inti nekrotik, serta meningkatnya kemungkinan terjadinya ruptur plak yang dapat memicu sindrom koroner akut. Di antara berbagai anggota keluarga MMP, MMP-9 merupakan enzim yang paling banyak diproduksi oleh makrofag dan neutrofil teraktivasi. Enzim ini mampu menguraikan kolagen tipe IV dan elastin yang merupakan komponen utama penyusun *fibrous cap*. Penelitian menunjukkan bahwa aktivitas MMP-9 pada plak aterosklerotik yang rentan dapat meningkat hingga tiga sampai lima kali lipat dibandingkan plak yang stabil..[19]

Molecular docking telah merevolusi paradigma *drug discovery* dengan memungkinkan prediksi *in silico* interaksi ligand-protein pada resolusi atomik, mengurangi waktu dan biaya pengembangan obat hingga 50-70%.[20] Pendekatan *structure-based drug design* menggunakan algoritma docking seperti AutoDock Vina, Glide, dan FlexX telah berhasil mengidentifikasi lead compounds dengan success rate 15-20% memasuki uji klinis, dibandingkan 0,01% pada pendekatan konvensional.[21] Dalam konteks inhibitor MMP, *molecular docking* memfasilitasi eksplorasi *binding pocket S1'* yang menentukan spesifisitas substrat, dengan parameter kritis meliputi: (1) koordinasi *zinc catalytic site*, (2) interaksi hidrofobik

dengan *subsites S1'-S3'*, (3) *hydrogen bonding network* dengan residu *backbone*, dan (4) konformasi bioaktif ligand.[22] Validasi protokol *docking* melalui *redocking* kristalografi dan *enrichment studies* menunjukkan akurasi prediksi pose 85-92% dengan RMSD <2 Å, sementara integrasi dengan molecular dynamics simulation meningkatkan reliabilitas prediksi afinitas pengikatan.[23]

Uji DPPH merupakan gold standard untuk evaluasi kapasitas antioksidan *in vitro*, dengan prinsip pengukuran kemampuan senyawa uji mendonorkan atom hidrogen atau elektron untuk menetralkan radikal DPPH yang berwarna ungu (λmax = 517 nm) menjadi DPPH-*H* yang tidak berwarna.[24] Kinetika reaksi DPPH mengikuti mekanisme *mixed-order*, di mana fase cepat (<1 menit) merepresentasikan transfer atom hidrogen dari gugus fenolik, sementara fase lambat (1-6 jam) melibatkan reaksi sekunder dan pembentukan produk dimerisasi.[25] Standarisasi protokol DPPH oleh AOAC International menetapkan parameter kritis: konsentrasi DPPH 100 μM dalam metanol, inkubasi 30 menit pada suhu kamar tanpa cahaya, dan penggunaan Trolox sebagai standar referensi dengan linearitas R^2 >0,999. [26] Korelasi antara nilai IC50 DPPH dengan biomarker stres oksidatif in vivo menunjukkan koefisien determinasi R^2 = 0,78-0,85, mengkonfirmasi relevansi translasional metode ini untuk prediksi aktivitas antioksidan fisiologis.[27]

Integrasi pendekatan molecular docking dan validasi antioksidan DPPH memberikan framework komprehensif untuk mengevaluasi potensi tokotrienol sebagai dual-action therapeutic agent yang menargetkan baik stres oksidatif maupun aktivitas proteolitik MMP dalam aterosklerosis. Hipotesis mekanistik mengusulkan bahwa tokotrienol dapat berinteraksi dengan active site MMP melalui: (1) kelasi *zinc catalytic center* oleh gugus hidroksil kromanil, (2) okupasi *hydrophobic pocket S1'* oleh rantai farnesil, dan (3) stabilisasi kompleks melalui π-π stacking dengan residu aromatik.[28]Aktivitas antioksidan tokotrienol yang divalidasi melalui uji DPPH diproyeksikan berkontribusi terhadap inhibisi MMP secara tidak langsung melalui: (1) penekanan *ROS-mediated activation of pro*-MMP, (2) preservasi *endogenous tissue inhibitors of metalloproteinases* (*TIMPs*), dan (3) modulasi *redox-sensitive transcription factors* yang meregulasi ekspresi MMP.[29] Sinergi antara efek antioksidan langsung dan inhibisi MMP diharapkan

menghasilkan efek antiaterogenik superior dibandingkan monoterapi konvensional.

Meskipun aktivitas antioksidan dan kardioprotektif tokotrienol minyak sawit telah banyak dilaporkan, termasuk kemampuannya dalam menurunkan ekspresi MMP-*2* dan MMP-*9* pada model hewan hiperkolesterolemia, mekanisme molekuler interaksi langsung tokotrienol dengan enzim *Matrix Metalloproteinase* dalam konteks aterosklerosis masih belum banyak dieksplorasi secara komputasional.[30] Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa tokotrienol menekan ekspresi matrix metalloproteinases dan memiliki efek antitrombotik dalam pencegahan aterosklerosis, namun belum ada studi yang secara spesifik menganalisis: (1) aktivitas antioksidan tokotrienol minyak sawit menggunakan metode DPPH, dan (2) interaksi molekuler tokotrienol dengan MMP-*2* dan MMP-*9* melalui pendekatan *docking* molekuler. MMP-*2* dan MMP-*9* merupakan enzim kunci dalam degradasi matriks ekstraseluler yang berperan dalam destabilisasi plak aterosklerotik .[31] Dengan mengkombinasikan pendekatan *in vitro* (uji antioksidan DPPH) dan *in silico* (*molecular docking*), penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman awal mengenai potensi tokotrienol minyak sawit sebagai inhibitor MMP dalam pencegahan aterosklerosis.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Bagaimana aktivitas antioksidan tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dan interaksinya terhadap enzim MMP-*2* dan MMP-*9* sebagai target terapi aterosklerosis?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis potensi antioksidan tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) sebagai inhibitor MMP-*2* dan MMP-*9* melalui uji DPPH dan *molecular docking*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan persentase inhibisi dan nilai IC_{50} aktivitas antioksidan tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

2. Menganalisis energi pengikatan (*binding energy*), konstanta inhibisi (Ki), dan jenis interaksi molekuler α-, β-, γ-, δ-tokotrienol minyak sawit terhadap enzim MMP-2 sebagai target jalur degradasi matriks ekstraseluler melalui studi *molecular docking*.
3. Menganalisis energi pengikatan (*binding energy*), konstanta inhibisi (Ki), dan jenis interaksi molekuler α-, β-, γ-, δ-tokotrienol minyak sawit terhadap enzim MMP-9 sebagai target jalur degradasi matriks ekstraseluler melalui studi *molecular docking*.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini akan memperkaya khazanah ilmu pengetahuan dengan menghasilkan bukti empiris baru mengenai mekanisme molekuler tokotrienol dari minyak kelapa sawit dalam menghambat *Matrix Metalloproteinase* (MMP) pada aterosklerosis, yang selama ini belum tereksplorasi secara komprehensif. Temuan ini akan berkontribusi pada pengembangan farmakognosi tanaman tropis Indonesia dan menjadi referensi penting untuk penelitian lanjutan tentang potensi terapeutik metabolit sekunder kelapa sawit, sekaligus memperkuat basis data ilmiah untuk pengembangan fitofarmaka kardiovaskular berbasis sumber daya alam lokal.

2. Manfaat bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini membuka peluang pemanfaatan produk samping industri kelapa sawit yang selama ini kurang optimal menjadi produk bernilai tinggi berupa nutraseutikal antiaterosklerosis, yang dapat meningkatkan nilai ekonomi komoditas kelapa sawit hingga 30-40% dan menciptakan lapangan kerja baru di sektor agroindustri. Masyarakat akan mendapatkan akses terhadap alternatif pencegahan penyakit kardiovaskular yang lebih terjangkau dan berbasis sumber daya lokal, sekaligus meningkatkan kesadaran akan potensi kesehatan dari biodiversitas Indonesia yang selama ini terabaikan.

3. Manfaat bagi pelayan Kesehatan

Penelitian ini menawarkan alternatif terapi adjuvan berbasis bahan alam untuk penatalaksanaan aterosklerosis yang memiliki profil keamanan lebih baik

dibandingkan inhibitor MMP sintetik, berpotensi mengurangi kejadian efek samping dan biaya pengobatan jangka panjang. Tenaga kesehatan akan memiliki opsi terapi komplementer yang *evidence-based* untuk pasien dengan risiko kardiovaskular tinggi atau intoleransi terhadap terapi konvensional, serta dapat mengintegrasikan pendekatan preventif berbasis nutraseutikal dalam protokol pencegahan primer dan sekunder penyakit kardiovaskular, sejalan dengan paradigma pelayanan kesehatan holistik dan *personalized medicine*.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

2.1.1 Taksonomi dan Klasifikasi Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan tanaman penghasil minyak yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan telah lama dikenal dalam kajian botani. Spesies ini pertama kali dideskripsikan secara ilmiah oleh Nicholas Joseph Jacquin pada tahun 1763 melalui penetapan genus *Elaeis* yang termasuk ke dalam famili Arecaceae. Nama *Elaeis* berasal dari bahasa Yunani, yaitu *elaion* yang berarti minyak, sedangkan epitet spesifik *guineensis* menunjukkan daerah asal tanaman yang berada di kawasan Guinea, Afrika Barat. Penamaan tersebut menggambarkan hubungan erat antara tanaman ini dengan wilayah asal persebarannya di pesisir Afrika Barat.[32,33]

Dalam sistem klasifikasi tumbuhan, kelapa sawit tergolong ke dalam famili Arecaceae, yang sebelumnya dikenal sebagai Palmaceae. Famili ini merupakan kelompok tumbuhan monokotil yang memiliki karakteristik khas berupa batang tunggal, sistem perakaran serabut, serta daun majemuk menyirip. Berdasarkan klasifikasi taksonomi, *Elaeis guineensis* ditempatkan sebagai berikut:[32]

Kingdom : Plantae
Divisi : Streptophyta
Kelas : Equisetopsida
Subkelas : Magnoliidae
Ordo : Arecales
Famili : Arecaceae
Subfamili : Arecoideae
Tribe : Cocoeae
Genus : *Elaeis*
Spesies : *Elaeis guineensis* Jacq.



Gambar 2.1. Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)[32]

Elaeis guineensis merupakan spesies allogamous dengan genom diploid yang terdiri dari 16 pasang kromosom homolog, dengan jumlah kromosom 2n = 2x = 32.[34] Kelapa sawit dikelompokkan bersama dengan *Cocos* dan genus lainnya dalam subfamili *Cocosoideae* dan *tribe Cocoeae*.[33]

2.1.2 Morfologi dan Karakteristik Botani

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan tanaman monokotil dari famili **Arecaceae** yang memiliki morfologi khas sebagai tumbuhan palma. Tanaman ini tumbuh dengan batang tunggal berbentuk silindris (*stipe*) yang menopang tajuk berupa 30–45 helai daun majemuk menyirip (*pinnate leaves*) berwarna hijau. Setiap helai daun dapat mencapai panjang sekitar 8–10 meter dan tersusun membentuk mahkota yang rapat pada bagian pucuk tanaman.[32] Dalam kondisi pertumbuhan optimal, tinggi tanaman dapat mencapai 15–30 meter. Meskipun umur biologisnya dapat mencapai sekitar 300 tahun, masa produktif kelapa sawit secara ekonomi umumnya berlangsung hingga ±25 tahun.[32]

Pertumbuhan vegetatif kelapa sawit dikendalikan oleh satu titik tumbuh (apical meristem) yang terletak di bagian tengah mahkota. Dari titik tumbuh tersebut berkembang daun baru serta infloresens atau rangkaian bunga. Sistem perakarannya berupa akar serabut yang berkembang luas baik secara horizontal maupun vertikal sehingga mampu mencapai kedalaman sekitar 5 meter. Struktur perakaran tersebut berperan penting dalam meningkatkan kemampuan tanaman menyerap air dan unsur hara dari dalam tanah.[33]

Kelapa sawit termasuk tanaman *monoecious* atau berumah satu, yaitu bunga jantan dan bunga betina berada pada individu tanaman yang sama, tetapi berkembang pada tandan bunga (*infloresens*) yang terpisah. Karakteristik reproduksi ini memungkinkan terjadinya penyerbukan silang secara alami maupun

dengan bantuan serangga penyerbuk, sehingga mendukung pembentukan buah dan produksi minyak yang optimal.[33]

2.1.3 Distribusi Geografis dan Produksi Global

Elaeis guineensis merupakan spesies kelapa sawit yang berasal dari kawasan Afrika Barat hingga Afrika Barat Daya, dengan daerah persebaran alami yang membentang dari Angola hingga Gambia. Seiring meningkatnya kebutuhan akan minyak nabati, tanaman ini kemudian diperkenalkan ke berbagai wilayah beriklim tropis di luar benua Afrika dan berhasil beradaptasi dengan baik pada lingkungan baru.[33]

Di Indonesia, kelapa sawit pertama kali dibawa oleh pemerintah kolonial Belanda ke Pulau Jawa pada tahun 1848 sebagai tanaman koleksi botani. Selanjutnya, pengembangan budidaya secara komersial mulai berkembang di berbagai wilayah tropis. Di Malaysia, yang saat itu masih dikenal sebagai Malaya di bawah pemerintahan Inggris, budidaya kelapa sawit dimulai pada tahun 1910 melalui prakarsa William Sime dan Henry Darby, yang kemudian menjadi pelopor berkembangnya industri kelapa sawit modern di negara tersebut.[33]

Saat ini, *Elaeis guineensis* telah tersebar luas dan dinaturalisasi di berbagai negara tropis, antara lain Madagaskar, Sri Lanka, Indonesia, Malaysia, Kamboja, negara-negara Amerika Tengah, Hindia Barat, serta sejumlah pulau di kawasan Samudra Hindia dan Samudra Pasifik. Adaptasi yang baik terhadap iklim tropis menyebabkan tanaman ini menjadi salah satu komoditas perkebunan paling penting di dunia.[33]

Indonesia dan Malaysia merupakan dua produsen utama minyak sawit dunia yang secara bersama-sama menyumbang sebagian besar produksi global. Dominasi kedua negara tersebut menjadikan minyak sawit sebagai minyak nabati dengan volume produksi terbesar di dunia. Pada tahun 2014, kontribusi minyak sawit diperkirakan mencapai sekitar **34% dari total produksi minyak nabati global**, menunjukkan perannya yang sangat strategis dalam memenuhi kebutuhan pangan, industri, kosmetik, dan energi terbarukan.[33]

2.1.4 Genus *Elaeis* dan Spesies Terkait

Genus *Elaeis* merupakan kelompok palma penghasil minyak yang

memiliki nilai ekonomi dan ilmiah penting. Meskipun beberapa ahli botani masih berbeda pendapat mengenai jumlah spesies yang termasuk dalam genus ini, sebagian besar klasifikasi modern mengakui adanya dua spesies utama yang telah teridentifikasi dengan jelas, yaitu *Elaeis guineensis* Jacq. dan *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés.[33]

1. ***Elaeis guineensis Jacq*. (Kelapa Sawit Afrika)**

   Elaeis guineensis merupakan spesies yang paling banyak dibudidayakan di dunia karena memiliki produktivitas minyak yang tinggi dan nilai ekonomi yang sangat besar. Budidaya komersial tanaman ini telah berkembang sejak awal abad ke-20 dan hingga saat ini menjadi sumber utama produksi minyak sawit (*palm oil*) maupun minyak inti sawit (*palm kernel oil*) yang diperdagangkan secara global. Sebagian besar kebutuhan minyak sawit dunia dipenuhi oleh spesies ini karena memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap lingkungan tropis serta potensi hasil yang tinggi.[33]

2. ***Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés (Kelapa Sawit Amerika)**

   Elaeis oleifera merupakan spesies asli Amerika Selatan yang tumbuh secara alami dan belum banyak dikembangkan sebagai tanaman perkebunan komersial. Walaupun produktivitas minyaknya lebih rendah dibandingkan *E. guineensis*, spesies ini memiliki sifat genetik yang menguntungkan, terutama ketahanan terhadap beberapa penyakit penting pada kelapa sawit. Oleh karena itu, persilangan antara *E. oleifera* dan *E. guineensis* telah dimanfaatkan dalam program pemuliaan tanaman di beberapa negara, seperti Kolombia, Peru, Ekuador, dan Brasil, untuk menghasilkan varietas hibrida yang lebih tahan penyakit sekaligus tetap memiliki produktivitas yang baik.[33]

Selain kedua spesies tersebut, beberapa publikasi juga melaporkan keberadaan spesies lain, seperti *Elaeis odora* dan *Elaeis madagascariensis*. Namun demikian, status taksonomi kedua spesies tersebut masih menjadi bahan kajian karena belum terdapat kesepakatan ilmiah mengenai pengakuannya sebagai spesies yang benar-benar terpisah dalam genus *Elaeis*.[33]

2.2 Minyak Sawit dan Komposisi Kimia

2.2.1 Jenis Minyak dari Kelapa Sawit

Buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) menghasilkan dua jenis minyak utama yang berasal dari bagian buah yang berbeda, sehingga memiliki karakteristik fisik maupun komposisi kimia yang tidak sama. Kedua jenis minyak tersebut dimanfaatkan secara luas dalam industri pangan, kosmetik, farmasi, maupun berbagai sektor industri lainnya.[33]

1. **Minyak Sawit (*Palm Oil/PO*)**

   Minyak sawit diperoleh melalui proses ekstraksi pada bagian **mesokarp** atau daging buah kelapa sawit. Minyak ini memiliki warna merah hingga jingga kemerahan yang khas akibat tingginya kandungan pigmen karotenoid, terutama β-karoten dan α-karoten. Selain kaya akan karotenoid, minyak sawit juga mengandung vitamin E, khususnya tokotrienol dan tokoferol, yang berperan sebagai antioksidan alami.[33]

2. **Minyak Inti Sawit (*Palm Kernel Oil/PKO*)**

   Minyak inti sawit dihasilkan dari ekstraksi **endosperma (kernel)** yang terdapat di dalam biji kelapa sawit. Dibandingkan minyak sawit, minyak inti sawit memiliki komposisi asam lemak yang berbeda, dengan proporsi asam lemak jenuh, terutama asam laurat dan asam miristat, yang lebih tinggi. Perbedaan komposisi tersebut menyebabkan sifat fisik, karakteristik kimia, serta penggunaannya dalam berbagai produk industri juga berbeda dengan minyak sawit yang berasal dari mesokarp.[33]

2.2.2 Komposisi Asam Lemak

Minyak kelapa sawit (*palm oil*) memiliki karakteristik yang khas karena mengandung komposisi asam lemak jenuh dan tidak jenuh dalam proporsi yang relatif seimbang. Susunan asam lemak tersebut berperan penting dalam menentukan sifat fisik, stabilitas oksidatif, serta nilai gizi minyak sawit. Keseimbangan komposisi ini menjadikan minyak sawit memiliki ketahanan yang baik terhadap proses pemanasan dan oksidasi dibandingkan beberapa jenis minyak nabati lainnya.[33]

Komponen utama asam lemak yang terdapat dalam minyak kelapa sawit meliputi:

1. Asam palmitat (C16:0) : sekitar 40–47%

2. Asam oleat (C18:1) : sekitar 37–40%
3. Asam linoleat (C18:2) : sekitar 9–12%
4. Asam stearat (C18:0) : sekitar 4–5%

Dominasi asam palmitat sebagai asam lemak jenuh dan asam oleat sebagai asam lemak tidak jenuh menghasilkan keseimbangan yang memberikan sifat fisik dan kimia yang menguntungkan. Minyak kelapa sawit memiliki titik leleh yang sesuai untuk berbagai proses pengolahan pangan, tetap stabil pada suhu tinggi, serta lebih tahan terhadap reaksi oksidasi selama penyimpanan maupun proses pemanasan. Selain itu, minyak sawit secara alami tidak mengandung asam lemak trans *(trans fatty acids)* sehingga menjadi salah satu pilihan minyak nabati yang banyak dimanfaatkan dalam industri pangan, terutama untuk proses penggorengan dan pengolahan makanan yang memerlukan stabilitas termal tinggi.[33]

2.3 Tokotrienol: Vitamin E dari Minyak Sawit

2.3.1 Struktur dan Klasifikasi Vitamin E

Vitamin E merupakan kelompok senyawa yang larut dalam lemak dan berperan sebagai antioksidan alami yang penting dalam melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Secara alami, vitamin E terdiri atas delapan isoform yang terbagi menjadi dua kelompok utama, yaitu empat isoform tokoferol (α-, β-, γ-, dan δ-tokoferol) serta empat isoform tokotrienol (α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol). Meskipun kedua kelompok tersebut memiliki aktivitas biologis yang serupa, terdapat perbedaan mendasar pada struktur kimianya yang memengaruhi sifat fisik, distribusi dalam jaringan, dan aktivitas biologis masing-masing senyawa.[35]

Perbedaan utama antara tokoferol dan tokotrienol terletak pada struktur rantai sampingnya. Tokoferol memiliki rantai samping *fitil (phytyl)* yang bersifat jenuh, sedangkan tokotrienol mempunyai rantai samping *isoprenoid (farnesyl)* yang mengandung tiga ikatan rangkap. Keberadaan ikatan rangkap tersebut meningkatkan fleksibilitas molekul tokotrienol sehingga lebih mudah berpenetrasi ke dalam lapisan fosfolipid membran sel. Karakteristik ini menyebabkan tokotrienol sering dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan efek biologis yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol pada berbagai kondisi patologis.[35]

Secara umum, seluruh isoform vitamin E memiliki dua komponen struktur utama, yaitu:

1. *Cincin chromanol*, yang mengandung gugus hidroksil fenolik sebagai pusat aktivitas antioksidan. Gugus hidroksil ini berfungsi mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas sehingga mampu menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid dan melindungi membran sel dari kerusakan oksidatif.
2. *Rantai samping hidrofobik*, yang berperan mempertahankan keberadaan molekul di dalam membran lipid. Pada tokoferol, rantai samping berupa rantai fitil jenuh ($C_{16}H_{33}$), sedangkan pada tokotrienol berupa rantai farnesil tidak jenuh ($C_{16}H_{27}$) yang memiliki tiga ikatan rangkap. Perbedaan struktur ini berpengaruh terhadap mobilitas molekul, distribusi jaringan, serta kemampuan berinteraksi dengan membran biologis.[35]

Selain perbedaan pada rantai samping, variasi jumlah dan posisi gugus metil yang terikat pada cincin chromanol menghasilkan empat isoform, yaitu α-, β-, γ-, dan δ-, baik pada kelompok tokoferol maupun tokotrienol. Masing-masing isoform memiliki karakteristik farmakologis, potensi antioksidan, dan aktivitas biologis yang berbeda, sehingga memberikan kontribusi yang beragam terhadap efek protektif vitamin E dalam menjaga keseimbangan stres oksidatif dan mencegah perkembangan berbagai penyakit degeneratif.[35]

2.3.2 Tokotrienol dalam Minyak Sawit

Minyak kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dikenal sebagai salah satu sumber alami tokotrienol yang paling melimpah dibandingkan minyak nabati lainnya. Kandungan vitamin E pada minyak sawit didominasi oleh fraksi tokotrienol, sehingga komoditas ini banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam pengembangan produk pangan fungsional, nutraseutikal, maupun sediaan farmasi. Keberadaan tokotrienol dalam jumlah tinggi menjadikan minyak sawit memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami yang berperan dalam pencegahan berbagai penyakit yang berkaitan dengan stres oksidatif.[36]

Fraksi kaya tokotrienol atau *Tokotrienol-Rich Fraction* (TRF) yang diperoleh dari minyak sawit mengandung beberapa isoform vitamin E dengan

proporsi yang berbeda. Komposisi umum TRF meliputi:

α-tokotrienol : sekitar 23–27%

β-tokotrienol : sekitar 3–4%

γ-tokotrienol : sekitar 35–40%

δ-tokotrienol : sekitar 10–12%

α-tokoferol : sekitar **20–25%**[36]

Berdasarkan komposisi tersebut, γ-tokotrienol merupakan isoform yang paling dominan dalam fraksi tokotrienol minyak sawit, diikuti oleh α-tokotrienol dan δ-tokotrienol. Variasi kandungan masing-masing isoform dipengaruhi oleh faktor genetik tanaman, tingkat kematangan buah, kondisi lingkungan, serta metode ekstraksi dan pemurnian yang digunakan selama proses pengolahan minyak.

Secara umum, perbandingan kandungan tokotrienol terhadap tokoferol dalam TRF minyak sawit berkisar **3:1**. Dominasi tokotrienol tersebut membedakan minyak sawit dari sebagian besar minyak nabati lainnya yang umumnya lebih kaya tokoferol. Komposisi ini menjadikan minyak sawit sebagai salah satu sumber alami tokotrienol terbaik, sehingga banyak dimanfaatkan dalam penelitian maupun pengembangan produk nutraseutikal dan farmasi yang bertujuan meningkatkan perlindungan terhadap stres oksidatif, inflamasi, dan berbagai penyakit degeneratif, termasuk aterosklerosis.[37]

2.3.3 Aktivitas Antioksidan Tokotrienol

Tokotrienol diketahui memiliki kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol dalam berbagai penelitian eksperimental. Kemampuan tersebut berkaitan dengan struktur kimianya yang memungkinkan interaksi lebih efektif dengan membran sel dan radikal bebas. Seperti seluruh anggota vitamin E, aktivitas antioksidan tokotrienol terutama berasal dari cincin *chromanol* yang mengandung gugus hidroksil fenolik. Gugus hidroksil tersebut berfungsi sebagai donor atom hidrogen untuk menetralisasi radikal peroksil, sehingga mampu menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid dan melindungi membran sel dari kerusakan akibat stres oksidatif.[35]

Keunggulan aktivitas antioksidan tokotrienol dibandingkan tokoferol

dipengaruhi oleh beberapa mekanisme biologis. Salah satu faktor utama adalah keberadaan rantai samping isoprenoid yang memiliki tiga ikatan rangkap. Struktur ini memberikan fleksibilitas molekul yang lebih tinggi sehingga tokotrienol dapat bergerak lebih cepat di dalam lapisan fosfolipid membran sel. Mobilitas tersebut memungkinkan distribusi yang lebih merata dan penetrasi yang lebih efisien ke berbagai jaringan, sehingga perlindungan terhadap membran biologis menjadi lebih optimal.[36]

Selain memiliki mobilitas membran yang lebih baik, tokotrienol juga menunjukkan kemampuan yang lebih tinggi dalam berpindah dan berintegrasi antar membran lipid. Karakteristik ini meningkatkan efisiensi penyebaran molekul antioksidan di dalam sel dibandingkan tokoferol, sehingga tokotrienol lebih cepat mencapai lokasi yang mengalami peningkatan pembentukan radikal bebas dan stres oksidatif.[35]

Berbagai penelitian juga menunjukkan bahwa kemampuan radical scavenging tokotrienol jauh lebih kuat dibandingkan α-tokoferol. Pada konsentrasi yang sama dalam sistem liposom, aktivitas penangkapan radikal bebas tokotrienol dilaporkan sekitar 40–60 kali lebih tinggi daripada α-tokoferol. Aktivitas tersebut menjadikan tokotrienol lebih efektif dalam menghambat oksidasi lipid, mempertahankan integritas membran sel, serta menurunkan pembentukan produk oksidasi yang berperan dalam perkembangan berbagai penyakit degeneratif, termasuk aterosklerosis.[36]

Keunggulan sifat antioksidan tersebut menjadi dasar pemanfaatan tokotrienol sebagai kandidat senyawa bioaktif dalam penelitian ini. Kemampuannya mengurangi stres oksidatif diperkirakan dapat menekan aktivasi jalur inflamasi, menghambat ekspresi Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) dan Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), serta meningkatkan stabilitas plak aterosklerotik. Oleh karena itu, evaluasi aktivitas antioksidan melalui metode DPPH dan analisis interaksi molekuler menggunakan molecular docking menjadi pendekatan yang relevan untuk mengkaji potensi terapeutik tokotrienol terhadap aterosklerosis.[35,36]

2.3.4 Bioaktivitas Tokotrienol dalam Kesehatan Kardiovaskular

Tokotrienol memiliki berbagai bioaktivitas yang relevan dengan kesehatan kardiovaskular di luar aktivitas antioksidannya, termasuk:

1. Efek Hipolipidemik:

Tokotrienol menurunkan kadar kolesterol serum dan meningkatkan *HDL-C* (*High-Density Lipoprotein Cholesterol*). Mekanisme ini melibatkan penghambatan enzim *HMG-CoA reductase*, enzim kunci dalam jalur sintesis kolesterol.[38–40]

2. Efek Anti-inflamasi:

Tokotrienol menghambat aktivasi faktor transkripsi NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*) yang terkait erat dengan tumorigenesis dan inflamasi. δ-tokotrienol adalah yang paling poten, diikuti oleh γ- dan α-tokotrienol dalam mengurangi mediator inflamasi.[41]

3. Efek Antitrombotik:

Tokotrienol menekan ekspresi *matrix metalloproteinases* dan memiliki efek antitrombotik, serta dapat menekan, meregresi, dan memperlambat progresi aterosklerosis.[37]

4. Modulasi Jalur *PPAR*:

Tokotrienol-rich fraction (*TRF*) dari minyak sawit mengaktivasi *PPARα*, *PPARγ*, dan *PPARδ* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) yang berperan penting dalam pencegahan perkembangan aterosklerosis melalui regulasi metabolisme energi dan inflamasi.[37]

5. Efek terhadap MMP:

Penelitian menunjukkan bahwa tokotrienol-α dan γ menurunkan ekspresi MMP-*2* dan MMP-*9* pada jantung hiperkolesterolemia, serta meningkatkan TGF-β (*Transforming Growth Factor-beta*) yang berperan dalam stabilitas plak.[42] Suplementasi tokotrienol murni juga mengurangi ekspresi jaringan aorta dari MMP-*9* dan MMP-*12* pada aterosklerosis dini dan lanjut.[43]

2.4 Aterosklerosis

2.4.1 Definisi dan Epidemiologi Aterosklerosis

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis pada dinding

pembuluh darah arteri berukuran besar dan sedang yang ditandai dengan akumulasi lipid, elemen fibrotik, dan kalsifikasi yang memicu penyempitan lumen pembuluh darah.[44] Penyakit ini merupakan faktor risiko utama penyakit kardiovaskular (*cardiovascular disease/CVD*) seperti penyakit jantung koroner dan gagal jantung, yang menjadi penyebab kematian utama secara global.

Istilah 'aterosklerosis' berasal dari bahasa Yunani *athere* yang berarti bubur dan *scleros* yang berarti keras, pertama kali diperkenalkan oleh dokter Jerman Felix J. Marchand (1846-1928).[45] Insiden penyakit kardiovaskular aterosklerotik terus meningkat secara global, terutama di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah. Pertumbuhan global dampak aterosklerosis didorong oleh populasi yang menua, prevalensi tinggi, dan kontrol suboptimal terhadap faktor kontributor seperti hipertensi dan diabetes.[44]

2.4.2 Patofisiologi Aterosklerosis

Patofisiologi aterosklerosis sangat terkait dengan inflamasi dan transisinya menjadi inflamasi kronis. Monosit/makrofag berada di pusat penggerak inflamasi plak dalam aterosklerosis dengan mekanisme molekuler yang luas dan kompleks.[44] Perkembangan aterosklerosis melibatkan beberapa tahap kunci:

1. Disfungsi Endotel:

Aterosklerosis dimulai dengan aktivasi dan disfungsi endotelium pembuluh darah. Faktor-faktor seperti hiperkolesterolemia, hipertensi, diabetes mellitus, merokok, dan stres oksidatif menyebabkan kerusakan pada sel endotel yang melapisi dinding arteri. Disfungsi endotel ditandai dengan berkurangnya produksi *nitric oxide* (*NO*), peningkatan permeabilitas endotel, dan ekspresi molekul adhesi seperti VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) dan ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*).[46]

2. Infiltrasi dan Akumulasi Lipid:

Lipoprotein densitas rendah (*Low-Density Lipoprotein*/LDL) menembus endotelium yang rusak dan terakumulasi di tunika intima. Di sana,

LDL mengalami modifikasi oksidatif menjadi *ox*-LDL (*oxidized* LDL) yang bersifat sangat aterogenik dan pro-inflamasi.[47]

3. Rekrutmen dan Infiltrasi Sel Inflamasi:

Ekspresi molekul adhesi pada sel endotel yang teraktivasi menyebabkan rekrutmen monosit dari sirkulasi. Monosit menempel pada endotel, bermigrasi ke dalam *tunika intima*, dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag ini mengekspresikan *scavenger receptors* yang mengenali dan menelan *ox*-LDL secara tidak terkontrol, bertransformasi menjadi sel busa (*foam cells*) yang merupakan ciri khas lesi aterosklerotik.[44]

4. Pembentukan *Fatty Streak* dan Plak Fibrous:

Akumulasi sel busa di tunika intima membentuk *fatty streak* (garis lemak), lesi aterosklerotik paling awal. Sel otot polos vaskular (*Vascular Smooth Muscle Cells/VSMC*) bermigrasi dari tunika media ke tunika intima, berproliferasi, dan mensintesis matriks ekstraseluler (ECM) termasuk kolagen untuk membentuk fibrous cap yang menutupi *core* lipid.[48]

5. Progresi Plak dan Instabilitas:

Seiring progres penyakit, terjadi peningkatan inflamasi kronis, kematian sel (apoptosis dan nekrosis), dan degradasi matriks ekstraseluler oleh enzim proteolitik seperti *matrix metalloproteinases* (MMP*s*). Hal ini menyebabkan penipisan *fibrous cap* dan pembentukan *necrotic core* yang besar, menjadikan plak rentan terhadap ruptur (Ajoolabady et al., 2024).[44]

6. Ruptur Plak dan Trombosis:

Ruptur plak aterosklerotik mengekspos material trombogenik dari *necrotic core* ke sirkulasi darah, memicu pembentukan trombus. Trombus yang oklusi dapat menyebabkan kejadian kardiovaskular akut seperti infark miokard dan stroke.[49]

2.4.3 Peran Stres Oksidatif dan Inflamasi

Stres oksidatif dan inflamasi kronis merupakan dua faktor kunci yang saling terkait dalam patogenesis aterosklerosis. *Reactive Oxygen Species* (*ROS*) yang berlebihan menyebabkan oksidasi LDL, kerusakan endotel, dan aktivasi jalur sinyal pro-inflamasi seperti NF-κB. Aktivasi NF-κB

menginduksi ekspresi sitokin pro-inflamasi (IL-1β, *IL-6*, TNF-*α*), molekul adhesi (VCAM-1, ICAM-1), dan enzim degradatif seperti MMP*s* (*Griendling & FitzGerald, 2003*).[50]

Lingkaran umpan balik positif antara stres oksidatif dan inflamasi menciptakan lingkungan mikro yang mendorong progresi aterosklerosis dan destabilisasi plak. Oleh karena itu, intervensi yang menargetkan stres oksidatif dan inflamasi, termasuk penggunaan antioksidan alami seperti tokotrienol, memiliki potensi terapeutik dalam pencegahan dan manajemen aterosklerosis.

2.5 Matrix Metalloproteinase *(MMP)*

2.5.1 Struktur dan Klasifikasi MMP

Matrix Metalloproteinases (MMP*s*) adalah keluarga besar enzim endopeptidase yang bergantung pada zinc yang bertanggung jawab untuk remodeling jaringan dan degradasi protein matriks ekstraseluler (*ECM*). MMP*s* dapat secara kolektif mendegradasi semua komponen ECM, termasuk kolagen, elastin, gelatin, fibronektin, dan proteoglikan.[51]

Famili MMP terdiri dari 28 anggota pada manusia yang diklasifikasikan berdasarkan struktur dan organisasi domain strukturalnya.[52] Setiap MMP mengandung setidaknya tiga domain protein homolog:

1. ***Signal peptide domain***: Mengarahkan MMP ke jalur sekretori
2. ***Propeptide domain***: Dihilangkan ketika MMP diaktivasi
3. ***Catalytic domain***: Mengandung region pengikat zinc yang penting untuk fungsi MMP sebagai *protease*
4. ***Hemopexin domain***: Berinteraksi dengan *tissue inhibitors of* MMP*s* (*TIMPs*) dan terlibat dalam pengikatan substrat

2.5.2 *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2)

MMP-*2*, juga dikenal sebagai *gelatinase A* atau *72-kDa gelatinase*, adalah anggota penting dari famili MMP yang memainkan peran kunci dalam berbagai proses fisiologis dan patologis. MMP-*2* disekresikan

oleh sel endotel, *VSMC*, fibroblas, osteoblas, makrofag, neutrofil, dan limfosit (Samah et al., 2023).[52]

Peran MMP-*2* dalam Aterosklerosis, MMP-*2* terlibat dalam berbagai tahap perkembangan aterosklerosis:

1. **Migrasi *VSMC***: MMP-*2* memfasilitasi migrasi *VSMC* yang diinduksi *ox*-LDL dari tunika media ke tunika intima, berkontribusi pada pembentukan *fibrous cap* di plak aterosklerotik.[52]
2. **Degradasi *ECM***: MMP-*2* mendegradasi komponen *ECM*, khususnya kolagen tipe IV (komponen utama membran basal), gelatin, elastin, dan fibronektin. Degradasi ini melemahkan struktur *fibrous cap* dan meningkatkan risiko ruptur plak.
3. **Stabilitas Plak**: Penelitian menunjukkan bahwa MMP-*2* lebih banyak diekspresikan dalam lesi yang kaya sel otot polos (*SMC-rich lesions*), yang dikaitkan dengan plak yang lebih stabil dibandingkan plak yang kaya makrofag.[53]
4. **Aktivasi Jalur Sinyal**: MMP-*2* merangsang degradasi *fibrous cap* dan ruptur plak aterosklerotik melalui beberapa jalur termasuk jalur *Akt*-NF-κB yang diinduksi oleh *HNE* (*4-hydroxy-2-nonenal*), dan jalur *NADPH oxidase* yang diinduksi oleh *angiotensin II* dan *ROS*.[52]

2.5.3 Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)

MMP-*9*, juga dikenal sebagai *gelatinase B* atau *92-kDa gelatinase*, adalah anggota famili MMP yang paling banyak diteliti dalam konteks aterosklerosis. Gen MMP-*9* manusia terletak pada kromosom *20q12.2-13.1* dan dapat disekresikan oleh berbagai tipe sel termasuk makrofag, *VSMC*, dan sel endotel.[54]

Regulasi Ekspresi MMP-*9*:

Region promotor gen MMP-*9* memiliki banyak situs pengikatan faktor transkripsi seperti *Nuclear Factor κB* (NF-κB), *Activator Protein-1* (*AP-1*), dan *Specificity Protein 1* (*Sp-1*). Faktor transkripsi ini dapat meningkatkan aktivitas transkripsi MMP-*9*.[54]

Peran MMP-*9* dalam Instabilitas Plak Aterosklerotik:

1. **Degradasi ECM**: MMP-*9* mendegradasi komponen *ECM* termasuk gelatin, kolagen tipe IV, V, VII, X, dan elastin. Degradasi berlebihan *ECM* menyebabkan penipisan *fibrous cap* dan meningkatkan kerentanan plak terhadap ruptur.[54]
2. **Biomarker Instabilitas Plak**: Kadar MMP-*9* yang bersirkulasi telah disarankan sebagai biomarker untuk memprediksi stabilitas plak aterosklerotik dan risiko kejadian kardiovaskular dan serebrovaskular yang merugikan di masa depan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa kadar serum MMP-*9* meningkat pada pasien dengan plak yang ruptur dibandingkan dengan pasien tanpa ruptur plak, dan bahwa MMP-*9* adalah prediktor independen ruptur plak.[54]

3. **Asosiasi dengan Plak *Vulnerable***: Studi menunjukkan bahwa kadar MMP-*9* lebih tinggi dalam plak vulnerable dibandingkan plak stabil. Lesi yang kaya makrofag menunjukkan aktivitas MMP-*9* yang lebih tinggi, sedangkan lesi yang kaya *SMC* menunjukkan aktivitas MMP-*2* yang lebih tinggi.[53]
4. **Inflamasi Plak**: MMP-*9* disekresikan oleh makrofag setelah stimulasi dengan mediator pro-inflamasi dan berkontribusi pada inflamasi plak dan progresi aterosklerosis.[54]

2.5.4 Regulasi MMP oleh *TIMP*

Aktivitas MMP diregulasi oleh *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (*TIMPs*), inhibitor endogen MMP*s*. Hingga saat ini, empat *TIMP* telah diidentifikasi:

- ***TIMP-1***: Dapat menghambat sebagian besar MMP*s* (MMP-*1*, MMP-*3*, dan MMP-*9* khususnya)
- ***TIMP-2***: Berikatan dengan afinitas baik terhadap MMP-*2*
- ***TIMP-3***: Inhibitor kuat MMP*s* yang terdapat dalam *ECM*
- ***TIMP-4***: Menunjukkan ekspresi spesifik jaringan dan terutama diekspresikan di jantung

Rasio antara MMP*s* dan inhibitornya (*TIMPs*) terhadap MMPs aktif bebas sangat penting dalam patogenesis penyakit kardiovaskular.

Ketidakseimbangan antara MMP*s* dan *TIMPs* mendukung degradasi *ECM* yang berlebihan dan destabilisasi plak.[55]

2.5.5 MMP sebagai Target Terapeutik

Mengingat peran kritis MMP-*2* dan MMP-*9* dalam destabilisasi plak aterosklerotik, enzim-enzim ini menjadi target terapeutik yang menarik untuk pencegahan ruptur plak dan kejadian kardiovaskular akut. Defisiensi MMP-*9* atau pemblokiran ekspresi MMP-*9* dapat menghambat inflamasi plak dan mencegah instabilitas plak aterosklerotik.[54]

Namun, inhibitor MMP spektrum luas menunjukkan hasil yang mengecewakan dalam uji klinis karena efek samping dan kurangnya spesifisitas.[56] Oleh karena itu, pendekatan yang lebih selektif, termasuk penggunaan senyawa alami seperti tokotrienol yang dapat memodulasi ekspresi MMP tanpa menghambat fungsi fisiologis normalnya, menjadi area penelitian yang menjanjikan.

2.6 Metode Uji DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

2.6.1 Prinsip Metode DPPH

Uji DPPH berbasis spektrofotometri merupakan salah satu metode yang paling luas digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari suatu senyawa maupun ekstrak karena sederhana, cepat, dan memiliki sensitivitas yang baik. DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) adalah radikal bebas yang stabil berwarna ungu tua dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm.

Prinsip metode ini didasarkan pada kemampuan antioksidan untuk mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada radikal DPPH, mengubahnya menjadi bentuk tereduksi (DPPH-*H)* yang berwarna kuning pucat. Perubahan warna ini dapat diukur secara spektrofotometri, dan penurunan absorbansi berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan sampel.[57]

Reaksi kimia: DPPH• (ungu) + *AH* (antioksidan) → DPPH-*H* (kuning) + A•

2.6.2 Keunggulan dan Keterbatasan Metode DPPH Keunggulan:

- Metode sederhana, cepat, dan sensitif
- Tidak memerlukan peralatan khusus selain spektrofotometer UV-Vis
- Radikal DPPH stabil dalam kondisi penyimpanan yang tepat
- Dapat digunakan untuk menganalisis sampel hidrofobik dan hidrofilik
- *Reproducible* dan *cost-effective*

Keterbatasan:

- Hanya mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas, bukan mekanisme antioksidan lainnya
- Dapat terpengaruh oleh kondisi pH dan pelarut
- Tidak dapat mengevaluasi aktivitas antioksidan dalam sistem biologis yang kompleks

2.6.3 Parameter IC_{50} dalam Uji DPPH

IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*) adalah konsentrasi antioksidan yang diperlukan untuk menghambat *50%* radikal DPPH. Nilai IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih kuat. Parameter ini dihitung dengan membuat kurva hubungan antara konsentrasi sampel (sumbu x) dan persen inhibisi (sumbu y), kemudian menentukan konsentrasi pada 50% inhibisi.[57]

Rumus perhitungan persen inhibisi: % Inhibisi = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

Dimana:

- A_0 = Absorbansi kontrol (DPPH tanpa sampel)
- A_1 = Absorbansi sampel (DPPH dengan sampel)

2.6.4 Prinsip *Molecular Docking*

Melalui pendekatan komputasional, *molecular docking* dimanfaatkan untuk mengestimasi bagaimana suatu ligan berorientasi dan berikatan pada sisi aktif protein target. konformasi optimal ligan (molekul kecil) ketika berikatan dengan target protein (*reseptor*) untuk membentuk kompleks yang stabil. Metode ini merupakan alat penting dalam drug design dan penemuan obat berbantuan komputer (*Computer-Aided Drug Design/CADD*).[58]

Proses *docking* molekuler melibatkan dua komponen utama:

1. **Algoritma pencarian (*search algorithm*)**: Mengeksplorasi berbagai konformasi dan orientasi ligan dalam situs pengikatan protein
2. **Fungsi *scoring***: Mengevaluasi dan memberi peringkat pada pose (konformasi) yang dihasilkan berdasarkan energi ikatan prediksi atau afinitas pengikatan

2.6.5 Tahapan Molecular docking

Proses *molecular docking* umumnya melibatkan beberapa tahapan:

1. Preparasi Struktur Protein:

- Download struktur 3D protein target dari database (misalnya PDB - Protein Data Bank)
- Penghapusan molekul air, ligan ko-kristal, dan ion
- Penambahan atom hidrogen polar
- Penetapan muatan dan tipe atom
- Minimisasi energi struktur

2. Preparasi Struktur Ligan:

- Menggambar struktur 2D ligan atau download dari database (misalnya *PubChem*)
- Konversi ke struktur 3D
- Optimisasi geometri (minimisasi energi)
- Penetapan fleksibilitas ikatan yang dapat berotasi

3. Penentuan Situs Pengikatan:

- Identifikasi situs aktif protein berdasarkan literatur atau prediksi komputasi
- Definisi *grid box* (kotak pencarian) yang mencakup situs pengikatan

4. Proses Docking:

- Menjalankan algoritma *docking*
- Sampling berbagai konformasi dan orientasi ligan
- Evaluasi interaksi ligan-protein

5. Analisis Hasil:

- Visualisasi kompleks ligan-protein
- Analisis jenis interaksi (ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, π-π *stacking*, dll.)

- Evaluasi energi ikatan (*binding energy*) dan konstanta inhibisi (Ki)

2.6.6 Software Molecular Docking

Beberapa software *molecular docking* yang umum digunakan:

1. AutoDock Vina:

- *Open-source* dan gratis
- Cepat dan akurat
- Mudah digunakan
- Kompatibel dengan PyRx GUI

2. PyRx:

- Interface grafis untuk AutoDock dan AutoDock Vina
- Memudahkan preparasi ligan dan protein
- Visualisasi hasil yang *user-friendly*

3. AutoDock 4.2:

- Versi klasik dengan berbagai algoritma pencarian
- Flexible *docking* untuk ligan dan protein

4. Discovery Studio:

- Software komersial dengan fitur lengkap
- Visualisasi dan analisis yang comprehensive

Parameter Penting dalam Docking Molekuler

1. *Binding Energy* (ΔG):Energi ikatan yang diprediksi antara ligan dan protein, dinyatakan dalam kcal/mol. Nilai yang lebih negatif menunjukkan afinitas pengikatan yang lebih kuat dan kompleks yang lebih stabil.
2. Konstanta Inhibisi (Ki):Ukuran afinitas ligan terhadap protein target. Ki dihitung dari energi ikatan menggunakan persamaan:

$$Ki = \exp(\Delta G / RT)$$

Dimana:

- ΔG = energi ikatan (kcal/mol)
- R = konstanta gas (1.987×10^{-3} kcal/mol·K)
- T = temperatur (298.15 K)

3. Interaksi Molekuler:

- **Ikatan hidrogen**: Interaksi antara donor dan akseptor hidrogen

- **Interaksi hidrofobik**: Interaksi antara residu hidrofobik
- **Interaksi elektrostatik**: Interaksi antara muatan positif dan negatif
- **π-π stacking**: Interaksi antara cincin aromatik

2.6.7 Validasi Metode *Docking*

Validasi metode *docking* penting untuk memastikan keakuratan prediksi. Metode validasi yang umum digunakan adalah *re-docking* atau *self-docking*, di mana ligan ko-kristal yang sudah diketahui posisinya di-*docking* kembali ke protein asalnya. *Root Mean Square Deviation* (*RMSD*) antara pose hasil docking dan pose kristalografi digunakan sebagai ukuran keakuratan. *RMSD* $\leq$ 2.0 Å umumnya dianggap dapat diterima.[59]

2.7 Farmakokinetik dan Toksikologi Tokotrienol

2.7.1 Absorpsi Tokotrienol

Tokotrienol merupakan salah satu anggota kelompok vitamin E yang bersifat larut dalam lemak, sehingga mekanisme absorpsinya mengikuti proses penyerapan lipid di saluran pencernaan. Setelah dikonsumsi secara oral, senyawa ini mengalami hidrolisis awal oleh enzim esterase di saluran cerna sebelum memasuki usus halus sebagai lokasi utama absorpsi. Keberadaan garam empedu berperan penting dalam proses emulsifikasi lemak dan pembentukan misel, yang memungkinkan tokotrienol diserap secara optimal melalui enterosit. Setelah melewati mukosa usus, tokotrienol dikemas ke dalam kilomikron dan dialirkan melalui sistem limfatik sebelum akhirnya memasuki sirkulasi sistemik.[60,61]

Meskipun memiliki aktivitas biologis yang tinggi, bioavailabilitas oral tokotrienol relatif lebih rendah dibandingkan α-tokoferol. Penelitian pada hewan menunjukkan bahwa bioavailabilitas δ-tokotrienol dan γ-tokotrienol hanya berkisar 8,5% dan 9%. Di antara seluruh isoform tokotrienol, α-tokotrienol dilaporkan memiliki tingkat absorpsi yang paling baik dibandingkan β-, γ-, maupun δ-tokotrienol.[61,62]

Besarnya bioavailabilitas tokotrienol pada manusia dipengaruhi oleh berbagai faktor dan bersifat bergantung pada dosis (*dose-dependent*). Faktor-faktor yang diketahui memengaruhi absorpsi tersebut antara lain sebagai berikut.

1. Status makanan. Konsumsi tokotrienol bersama makanan yang

mengandung lemak meningkatkan bioavailabilitas sekitar 2,5–3,5 kali dibandingkan konsumsi pada kondisi puasa. Kondisi tersebut ditunjukkan oleh peningkatan nilai *Area Under the Curve* (AUC), yang mencerminkan jumlah senyawa yang berhasil mencapai sirkulasi sistemik.[60]

2. Bentuk formulasi. Penggunaan sistem *Self-Emulsifying Drug Delivery System* (SEDDS) terbukti mampu meningkatkan absorpsi tokotrienol secara signifikan. Formulasi berbasis annatto menunjukkan bioavailabilitas yang lebih tinggi dibandingkan *Tokotrienol-Rich Fraction* (TRF) dari minyak sawit. Pada formulasi tersebut, δ-tokotrienol memiliki nilai AUC tertinggi, yaitu sekitar 7450 ± 89 ng/mL.[63]
3. Keberadaan α-tokoferol. Tingginya kadar α-tokoferol dapat menurunkan bioavailabilitas tokotrienol karena terjadi kompetisi terhadap α-tocopherol transfer protein (α-TTP) di hati. Kompetisi ini memengaruhi distribusi dan retensi tokotrienol dalam sirkulasi sehingga konsentrasinya menjadi lebih rendah dibandingkan apabila diberikan tanpa α-tokoferol.[38]

Hasil penelitian farmakokinetik pada manusia menunjukkan bahwa tokotrienol memiliki karakteristik absorpsi yang relatif cepat. Nilai Tmax seluruh isoform umumnya berada pada kisaran 3–5 jam, sedangkan α-tokoferol mencapai konsentrasi puncak sekitar 6 jam setelah pemberian. Nilai Cmax bergantung pada dosis dan jenis isoform, dengan δ-tokotrienol dosis 750–1000 mg menghasilkan konsentrasi plasma sekitar 1444–1592 ng/mL. Selain itu, tokotrienol memiliki waktu paruh (*half-life*) yang relatif singkat, yaitu sekitar 2,3–4,4 jam, sehingga memerlukan pemberian berulang untuk mempertahankan kadar plasma yang optimal. Nilai AUC juga meningkat seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan, menunjukkan adanya hubungan dosis-respons yang jelas.[38]

2.7.2 Distribusi Tokotrienol

Walaupun kadar tokotrienol dalam plasma relatif rendah dan waktu paruhnya singkat, berbagai penelitian biodistribusi menunjukkan bahwa senyawa ini mampu mencapai berbagai organ dan jaringan dengan konsentrasi yang cukup untuk menghasilkan efek biologis. Temuan tersebut mengindikasikan bahwa efektivitas tokotrienol tidak hanya ditentukan oleh kadar plasma, tetapi juga oleh kemampuannya berdistribusi dan terakumulasi pada jaringan target.[61]

Setelah diserap di usus, tokotrienol diangkut di dalam sirkulasi melalui partikel lipoprotein. Berbeda dengan tokoferol yang terdistribusi relatif merata pada seluruh fraksi lipoprotein, tokotrienol lebih banyak ditemukan pada fraksi High-Density Lipoprotein (HDL) sekitar 4–8 jam setelah konsumsi. Karakteristik ini menunjukkan adanya mekanisme transport yang tidak sepenuhnya bergantung pada α-tocopherol transfer protein (α-TTP).[64]

Rantai samping isoprenoid yang tidak jenuh memberikan fleksibilitas molekul sehingga tokotrienol lebih mudah menembus membran biologis dan memasuki jaringan yang kaya lipid, seperti otak, hati, kulit, serta jaringan adiposa. Distribusi ke jaringan berlangsung melalui dua mekanisme utama, yaitu degradasi lipoprotein oleh enzim lipoprotein lipase yang menghasilkan partikel remnan, serta proses endositosis yang dimediasi reseptor lipoprotein. Kedua mekanisme tersebut memungkinkan tokotrienol mencapai berbagai organ target secara efisien.

Penelitian pada manusia yang menggunakan suplementasi 400 mg Tokotrienol-Rich Fraction (TRF) selama 4–96 minggu menunjukkan bahwa tokotrienol terakumulasi pada berbagai jaringan tubuh. Konsentrasi tertinggi ditemukan pada jaringan adiposa dengan kadar sekitar 34 nmol/g setelah empat minggu suplementasi. Selain itu, α-tokotrienol juga terdeteksi pada korteks dan hipokampus otak dalam konsentrasi yang diperkirakan memberikan efek neuroprotektif. Akumulasi substansial juga ditemukan pada hati, otot jantung, kulit, serta kelenjar adrenal, yang mendukung berbagai aktivitas biologis seperti perlindungan terhadap stres oksidatif, efek kardioprotektif, dan fotoprotektif.[61]

Hasil penelitian pada hewan memperlihatkan bahwa pemberian tokotrienol secara oral meningkatkan kadar senyawa tersebut dalam darah, jaringan adiposa, hati, otot jantung, kulit, serta jaringan otak secara bertahap sesuai lamanya suplementasi (*time-dependent*).[65] Temuan ini menunjukkan bahwa distribusi tokotrienol berlangsung secara progresif dan dipengaruhi oleh durasi pemberian.

Menariknya, walaupun afinitas tokotrienol terhadap α-TTP hanya sekitar 12% dibandingkan α-tokoferol, penelitian menggunakan mencit *α-TTP knockout* menunjukkan bahwa tokotrienol tetap mampu mencapai berbagai organ vital. Fakta tersebut mengindikasikan adanya mekanisme transport alternatif yang independen terhadap α-TTP, meskipun jalur molekuler yang terlibat hingga kini

masih terus diteliti.[61]

2.7.3 Metabolisme Tokotrienol

Setelah didistribusikan ke berbagai jaringan tubuh, tokotrienol mengalami proses metabolisme terutama di hati. Jalur metabolisme yang dilalui pada dasarnya sama dengan tokoferol, namun kecepatan metabolisme tokotrienol lebih tinggi sehingga waktu paruh plasmanya lebih singkat dan bioavailabilitas sistemiknya relatif lebih rendah dibandingkan α-tokoferol. Karakteristik tersebut berpengaruh terhadap konsentrasi tokotrienol dalam sirkulasi, meskipun tidak mengurangi potensi aktivitas biologisnya pada jaringan target.[66]

1. Jalur Metabolisme

Biotransformasi tokotrienol berlangsung melalui dua tahap utama, yaitu reaksi fase I berupa ω-hidroksilasi dan dilanjutkan dengan proses β-oksidasi. Pada tahap pertama, gugus metil terminal pada rantai samping tokotrienol mengalami hidroksilasi yang dikatalisis oleh enzim sitokrom P450, terutama CYP4F2 dan CYP3A4. Enzim CYP4F2 diketahui berperan dominan dalam mengawali pembentukan senyawa karboksikromanol melalui proses ω-hidroksilasi. Penelitian menunjukkan bahwa tokotrienol memiliki nilai Vmax yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol, sehingga proses metabolisme berlangsung lebih cepat.[67]

Tahap berikutnya adalah β-oksidasi, yaitu pemendekan rantai samping melalui lima siklus oksidasi berturut-turut. Setiap siklus menghilangkan dua atom karbon hingga akhirnya terbentuk dua metabolit utama, yaitu Carboxymethylbutyl-hydroxychromans (CMBHC) yang masih memiliki rantai samping lima atom karbon dan Carboxyethyl-hydroxychromans (CEHC) yang merupakan metabolit akhir dengan rantai samping tiga atom karbon.

2. Karakteristik Metabolit

Metabolit tokotrienol, baik α-, β-, γ-, maupun δ-CEHC serta CMBHC, tetap mempertahankan struktur cincin chromanol beserta gugus hidroksil fenoliknya. Oleh karena itu, metabolit tersebut masih mempunyai aktivitas antioksidan meskipun potensi biologisnya lebih rendah dibandingkan senyawa induknya.[68]

Walaupun jalur metabolisme tokotrienol dan tokoferol relatif serupa,

terdapat beberapa karakteristik yang membedakan keduanya. Tokotrienol menghasilkan proporsi CMBHC yang lebih tinggi dibandingkan CEHC, terutama pada penelitian menggunakan kultur sel HepG2. Selain itu, sebagian metabolit tokotrienol masih mempertahankan ikatan rangkap pada rantai sampingnya, sedangkan tingkat metabolisme antarisoform juga berbeda. Isoform γ-tokotrienol dan δ-tokotrienol dilaporkan mengalami metabolisme lebih ekstensif dibandingkan α-tokotrienol.[6 8]

3. Regulasi Ekspresi Enzim

Selain berfungsi sebagai substrat metabolisme, tokotrienol juga diketahui memengaruhi ekspresi berbagai enzim yang berperan dalam metabolisme obat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian tokotrienol dapat meningkatkan ekspresi Cytochrome P450 (CYP450), terutama CYP3A4 dan CYP3A5, serta enzim UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) dan Multidrug Resistance Protein-1 (MDR1). Induksi tersebut terjadi melalui aktivasi Pregnane X Receptor (PXR) dan Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) yang berfungsi mengatur metabolisme serta proses detoksifikasi berbagai senyawa asing di hati dan usus.[6 9]

4. Konjugasi Metabolit

Sebelum dieliminasi dari tubuh, metabolit CEHC dan CMBHC terlebih dahulu mengalami reaksi metabolisme fase II berupa konjugasi. Jalur yang paling dominan adalah glukuronidasi yang berlangsung di hati, sedangkan sulfatasi merupakan jalur alternatif yang terjadi pada sebagian kecil metabolit. Konjugasi ini meningkatkan kelarutan metabolit dalam air sehingga mempermudah proses ekskresi melalui ginjal maupun empedu.

2.7.4 Ekskresi Tokotrienol

Eliminasi tokotrienol beserta metabolitnya berlangsung melalui dua jalur utama, yaitu ekskresi urin dan ekskresi feses. Dominasi masing-masing jalur dipengaruhi oleh tingkat kepolaran metabolit yang terbentuk selama proses metabolisme.

1. Ekskresi Melalui Urin

Metabolit CEHC memiliki sifat lebih hidrofilik sehingga sebagian besar dikeluarkan melalui urin dalam bentuk konjugat glukuronida maupun sulfat.

Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa suplementasi γ-tokotrienol meningkatkan kadar γ-CEHC urin sekitar empat hingga enam kali lipat dibandingkan kondisi sebelum suplementasi. Konsentrasi tertinggi metabolit tersebut ditemukan sekitar sembilan jam setelah konsumsi 125 mg γ-tokotrienyl acetate. Selain itu, sekitar 1–2% α-tokotrienyl acetate dan 4–6% γ-tokotrienyl acetate yang dikonsumsi dapat dipulihkan kembali sebagai metabolit CEHC dalam urin. Peningkatan kadar α-CEHC secara bermakna umumnya baru terlihat pada pemberian dosis tinggi, yaitu lebih dari 500 mg. Penelitian juga menunjukkan bahwa sebagian besar metabolit vitamin E yang diekskresikan melalui urin berada dalam bentuk konjugat glukuronida, berbeda dengan laporan awal yang menyatakan bahwa metabolit sulfat merupakan bentuk dominan pada hewan percobaan.[68,70]

2. Ekskresi Melalui Feses

Berbeda dengan CEHC, metabolit CMBHC memiliki sifat yang lebih lipofilik sehingga cenderung dieliminasi melalui empedu dan selanjutnya dikeluarkan bersama feses. Walaupun CMBHC masih dapat ditemukan dalam urin, konsentrasinya jauh lebih rendah dibandingkan CEHC. Selain metabolit tersebut, feses juga mengandung tokotrienol yang tidak terserap selama proses absorpsi serta metabolit antara yang belum mengalami konjugasi.

Analisis terhadap sampel feses menunjukkan adanya kandungan tokotrienol, tokoferol, dan berbagai metabolitnya dalam jumlah yang cukup tinggi. Temuan ini mengindikasikan bahwa jalur fekal merupakan rute eliminasi utama vitamin E. Penelitian lain memperlihatkan bahwa inkubasi tokoferol dengan suspensi feses pada kondisi anaerob tidak menghasilkan metabolit degradasi rantai samping, sehingga metabolit yang ditemukan dalam feses diduga terutama berasal dari sekresi empedu, bukan hasil metabolisme oleh mikroflora usus.[68]

3. Kinetika Ekskresi

Secara farmakokinetik, tokotrienol mengalami penurunan konsentrasi plasma dengan cepat dan umumnya hampir tidak terdeteksi dalam waktu 24 jam setelah konsumsi. Sebaliknya, metabolit δ-CEHC dan δ-CMBHC masih dapat ditemukan dalam plasma maupun urin hingga sekitar 12 jam setelah dosis terakhir

diberikan. Kadar metabolit tersebut bahkan dilaporkan 30–60 kali lebih tinggi dibandingkan konsentrasi tokotrienol induk, yang menunjukkan bahwa tokotrienol mengalami proses metabolisme yang sangat ekstensif sebelum dieliminasi dari tubuh.[6 8]

2.7.5 Toksikologi dan Keamanan Tokotrienol

Tokotrienol telah dievaluasi secara ekstensif untuk keamanan dan toksisitasnya melalui studi praklinis dan klinis, dengan hasil yang menunjukkan profil keamanan yang sangat baik.

Studi Toksisitas Praklinis:

Berbagai studi toksikologi hewan telah dilakukan untuk menentukan keamanan tokotrienol:

1. **Toksisitas Akut:** Studi pada tikus menunjukkan tidak ada efek toksikologis yang signifikan pada dosis hingga 2500 mg tokotrienol murni per kg berat badan per hari.
2. **Toksisitas Subkronik (13 minggu):** Studi pada tikus Sprague-Dawley menunjukkan:
   - *NOAEL* (*No-Observed-Adverse-Effect Level*) untuk tikus jantan: 120 mg/kg BB/hari
   - *NOAEL* untuk tikus betina: 130 mg/kg BB/hari
   - Tidak ada tanda klinis toksisitas, efek merugikan pada berat badan, atau mortalitas yang terkait dengan perlakuan
   - Beberapa perubahan parameter hematologi dan kimia klinis yang secara statistik signifikan, tetapi umumnya bergantung dosis dan tidak dianggap signifikan secara toksikologis[71]
3. **Toksisitas Kronik (52 minggu):** Studi jangka panjang pada tikus Wistar Hannover yang mengonsumsi diet tokotrienol selama 52 minggu menunjukkan:
   - *NOAEL* untuk tikus jantan: 303 mg/kg BB/hari
   - *NOAEL* untuk tikus betina: 472 mg/kg BB/hari
   - Tidak ada lesi hepatosit proliferatif atau efek merugikan signifikan pada dosis ini[72]

Studi Keamanan Klinis pada Manusia:

Lebih dari 30 uji klinis dengan berbagai dosis dan formulasi tokotrienol telah dilakukan pada manusia, menunjukkan profil keamanan yang sangat baik:

1. **Dosis dan Durasi:**

- Dosis hingga 1600 mg per hari (dosis tunggal) telah dievaluasi tanpa efek samping terkait obat
- Dosis hingga 3200 mg per hari (administrasi ganda selama 14 hari berturut-turut) ditoleransi dengan baik
- Suplementasi jangka panjang hingga 240 mg/hari selama 48 bulan tidak menunjukkan efek merugikan

2. **Tidak Ada *Dose-Limiting Toxicity*:** Studi fase I pada 36 subjek sehat yang menerima δ-tokotrienol oral 100-1600 mg sebagai dosis tunggal atau dua kali sehari selama 14 hari menunjukkan:

- Tidak ada kejadian merugikan terkait obat yang diamati
- Tidak ada toksisitas *dose-limiting*
- Semua kejadian merugikan yang dilaporkan adalah grade 1 atau 2 dan tidak terkait dengan tokotrienol[74]

3. **Keamanan dalam Populasi Khusus:**

- **Pasien dengan *NAFLD***: Suplementasi δ-tokotrienol 300 mg dua kali sehari selama 12 minggu aman dan efektif menurunkan enzim hati, marker inflamasi, dan stres oksidatif tanpa efek samping[75]
- **Pasien dengan metabolic syndrome**: Tidak ada efek pada hematotoksisitas atau hepatotoksisitas pada dosis 400 mg/hari selama 14 hari
- **Wanita postmenopause**: Suplementasi 600 mg δ-tokotrienol aman dan ditoleransi dengan baik tanpa kejadian merugikan serius[76]

Status Regulasi:

1. **FDA *(*Food and Drug Administration*):***

- Tokotrienol telah ditetapkan sebagai *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) oleh *FDA* pada April 2000
- Dosis yang direkomendasikan untuk suplementasi: 13-20 mg per hari dari makanan
- *Institute of Medicine* (*IOM*) merekomendasikan asupan vitamin E 200-

1000 mg per hari, yang dapat diperoleh melalui suplementasi

2. **EFSA *(*European Food Safety Authority*):***

- Panel *AFC* mengakui bahwa pada dosis 5 mg/kg BB/hari, tidak ada efek merugikan terlihat pada manusia
- Batas atas untuk vitamin E tidak dapat diperluas langsung untuk penilaian keamanan tokotrienol karena perbedaan bioavailabilitas dan distribusi

3. **CIR *(*Cosmetic Ingredient Review*):***

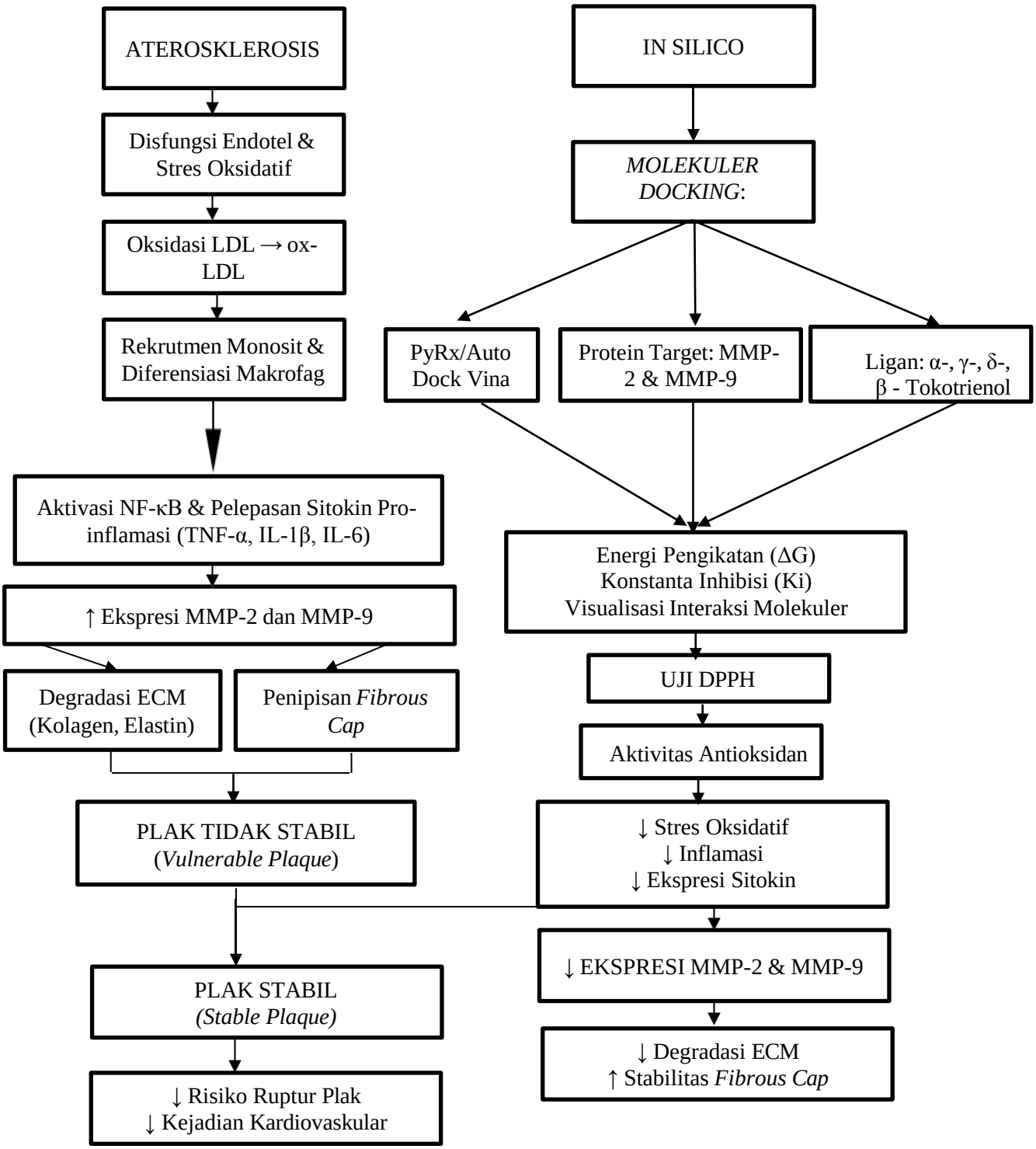
- Panel Ahli *CIR* menyimpulkan bahwa tokotrienol aman untuk digunakan dalam produk kosmetik
- Tidak ada efek merugikan dermal, iritasi kulit, atau sensitisasi yang dilaporkan
- Aplikasi topikal tokotrienol menunjukkan pengurangan signifikan iritasi kulit, kadar histamin serum, dan penebalan dermal

Interaksi Obat dan Pertimbangan Khusus:

1. **Interaksi dengan Antikoagulan:** Pada dosis tinggi, vitamin E dapat berinteraksi dengan obat antikoagulan seperti aspirin dan warfarin. Namun, pada dosis ideal hingga menengah (<300 mg/hari), tokotrienol tampak aman tanpa interaksi obat yang signifikan.

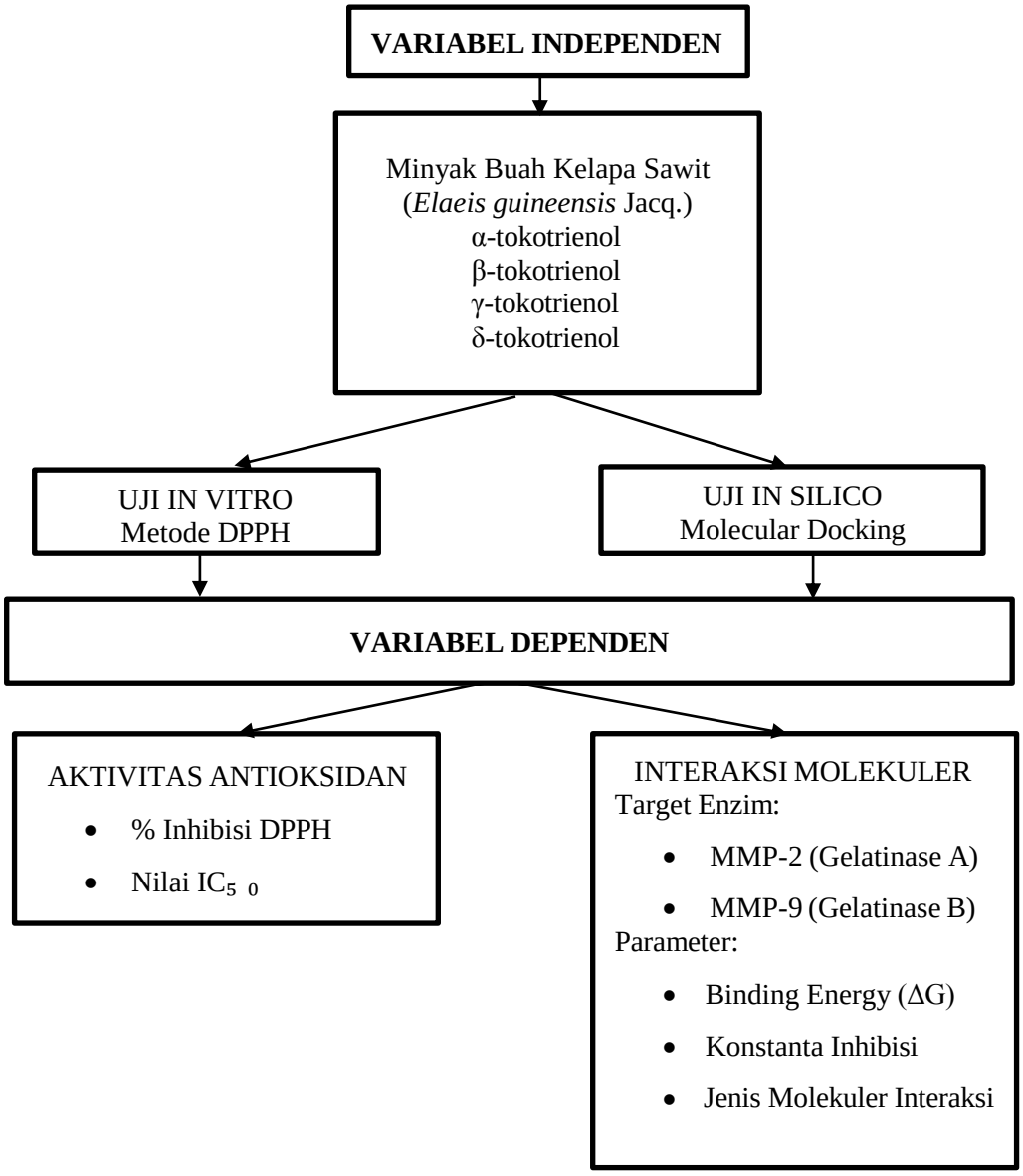
2. **Interaksi dengan Obat Lain:** Tokotrienol dapat menghambat mekanisme yang terkait dengan tamoxifen dan cyclosporine. Kehati-hatian diperlukan ketika menggunakan tokotrienol bersamaan dengan obat-obatan ini.
3. **Induksi Enzim Metabolisme:** Tokotrienol meningkatkan ekspresi *CYP3A4* dan enzim metabolisme obat lainnya, yang berpotensi mempengaruhi farmakokinetik obat lain yang dimetabolisme oleh enzim-enzim ini.

2.7 Kerangka Teori



Gambar 2.2 Kerangka Teori

2.8 Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka Konsep

2.9 Hipotesis

1. Hipotesis Nol (H_0): Tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) tidak memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan dan tidak berinteraksi dengan enzim MMP-2 dan MMP-9 sebagai target terapi aterosklerosis.
2. Hipotesis Alternatif (H_1): Tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan dan berinteraksi dengan enzim MMP-2 dan MMP-9 sebagai target terapi aterosklerosis.

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Defenisi Operasional

Definisi operasional dalam Tabel 3.1 dimaksudkan untuk memberikan gambaran yang jelas mengenai batasan operasional dan variabel yang digunakan dalam penelitian ini.

Tabel 3.1 Defenisi Operasional

Variabel	Defenisi Operasional	Cara Ukur	Skala	Hasil Ukur
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN (METODE DPPH)				
Konsentrasi Ekstrak *Tocotrienol-Rich Fraction* (TRF) Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)	Konsentrasi larutan ekstrak tokotrienol dari buah kelapa sawit yang mengandung campuran α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol dalam berbagai tingkat konsentrasi untuk uji aktivitas antioksidan metode DPPH	Preparasi larutan ekstrak *Tocotrienol-Rich Fraction* (TRF) dengan pengenceran serial menggunakan pelarut *methanol*/etanol dengan rumus: $V_1M_1 = V_2M_2$ Konsentrasi yang diuji: 150, 300, 450, 600 ppm	Numerik (Rasio)	Konsentrasi dalam satuan ppm (µg/mL) yang akan digunakan untuk membuat kurva regresi linear terhadap % inhibisi
Absorbansi DPPH	Nilai absorbansi larutan DPPH dengan atau tanpa sampel yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm	Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis setelah inkubasi 30 menit di ruang gelap pada suhu ruang	Numerik (Rasio)	Nilai absorbansi (A) yang digunakan untuk menghitung % inhibisi:[77] • A_0 = absorbansi kontrol • A_1 = absorbansi sampel
Aktivitas Antioksidan (%	Kemampuan ekstrak tokotrienol dalam	Metode DPPH	Numerik (Rasio)	Persentase inhibisi (%)

Inhibisi)	menghambat radikal bebas DPPH yang diukur berdasarkan penurunan absorbansi pada λ 517 nm	dengan rumus: % Inhibisi = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ A_0 = absorbansi kontrol A_1 = absorbansi sampel		radikal DPPH pada berbagai konsentrasi sampel77
Nilai IC_{50}	Konsentrasi ekstrak tokotrienol yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH	Analisis regresi linear dari kurva hubungan konsentrasi sampel (x) vs % inhibisi (y), kemudian substitusi y = 50 ke dalam persamaan regresi	Numerik (Rasio)	Nilai IC_{50} dalam satuan µg/mL atau ppm:77 Senyawa dengan IC_{50} di bawah 50 µg/mL (ppm) memiliki potensi antioksidan sangat kuat. Nilai 50–100 µg/mL
Kontrol Positif (Uji DPPH)	Senyawa antioksidan standar yang digunakan sebagai pembanding (Asam Askorbat atau Trolox)	Metode DPPH sama dengan sampel uji pada berbagai konsentrasi (150, 300, 450, 600 ppm)	Numerik (Rasio)	Nilai IC_{50} (µg/mL) kontrol positif untuk membanding kan aktivitas antioksidan sampel77
MOLECULAR DOCKING				

Struktur Protein MMP-2	Struktur protein 3D yang diperoleh melalui situs Protein Data Bank (PDB) dengan nomor ID: 1HOV atau struktur kristalografi MMP-2 yang tervalidasi	Mengunduh struktur protein dari database PDB/UniProt dengan nomor ID yang sesuai, kemudian dilakukan preparasi protein	Numerik	Semakin rendah nilai energi pengikatan (binding energy; < 0 kcal/mol) dan konstanta inhibisi (< 1 mM), maka semakin kuat afinitas ikatan antara ligan dan protein target.
		(cleaning, penambahan hidrogen, removal molekul air)		interaksi ligan dan protein78
Struktur Protein MMP-9	Struktur protein 3D yang diperoleh melalui situs Protein Data Bank (PDB) dengan nomor ID: 1GKC, 1GKD, atau struktur kristalografi MMP-9 yang tervalidasi	Mengunduh struktur protein dari database PDB/UniProt dengan nomor ID yang sesuai, kemudian dilakukan preparasi protein (cleaning, penambahan hidrogen, removal molekul air)	Numerik	Interaksi ligan dengan protein target cenderung semakin kuat apabila energi pengikatannya bernilai lebih negatif (< 0 kcal/mol) dan konstanta inhibisinya kurang dari 1 mM.

Struktur Senyawa α-Tokotrienol	Struktur senyawa aktif yang diperoleh dari situs PubChem dengan nomor CID: 5282347	Mengunduh struktur senyawa dari PubChem dengan format SDF/MOL kemudian dikonversi ke format PDBQT menggunakan Open Babel atau PyRx	Numerik	Semakin kecil energi pengikatan (< 0 kcal/mol) dan konstanta penghambatan (< 1 mM) maka semakin kuat interaksi ligan dan protein79
Struktur Senyawa β-Tokotrienol)	Struktur senyawa aktif yang diperoleh dari situs PubChem dengan nomor CID: 5282348	Mengunduh struktur senyawa dari PubChem dengan format SDF/MOL kemudian dikonversi ke format PDBQT menggunakan Open Babel atau PyRx	Numerik	Semakin kecil energi pengikatan (< 0 kcal/mol) dan konstanta penghambatan (< 1 mM) maka semakin kuat interaksi ligan dan protein79
Struktur Senyawa γ-Tokotrienol	Struktur senyawa aktif yang diperoleh dari situs PubChem dengan nomor CID: 5282349	Mengunduh struktur senyawa dari PubChem dengan format SDF/MOL kemudian dikonversi ke format PDBQT menggunakan Open Babel atau PyRx	Numerik	Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa kompleks ligan–protein memiliki stabilitas yang lebih baik apabila nilai **binding energy** semakin rendah (lebih negatif dari **0 kcal/mol**) dan

				nilai **konstanta inhibisi (Ki)** kurang dari **1 mM**.
Struktur Senyawa δ-Tokotrienol	struktur senyawa aktif diperoleh dari data PubChem melalui proses pengunduhan menggunakan Compound ID (CID) 5282350.	data PubChem dalam format SDF/MOL. Berkas hasil unduhan kemudian diubah ke format PDBQT menggunakan aplikasi Open Babel maupun PyRx,	Numerik	Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa kompleks ligan–protein memiliki stabilitas yang lebih baik apabila nilai **binding energy** semakin rendah (lebih negatif dari **0 kcal/mol**) dan nilai **konstanta inhibisi (Ki)** kurang dari **1 mM**.
Binding Energy (ΔG)	Energi ikatan yang diprediksi antara ligan (tokotrienol) dan protein target (MMP-2 atau MMP-9) hasil dari *molecular docking* menggunakan AutoDock Vina	Molecular docking menggunakan software PyRx/AutoDock Vina dengan output energi ikatan dalam kcal/mol	Numerik (Rasio)	Nilai ΔG (kcal/mol):[80] • Sangat kuat: < -10.0 • Kuat: -10.0 hingga -7.5 • Sedang: -7.5 hingga -5.0 • Lemah: > -5.0

Konstanta Inhibisi (Ki)	Ukuran afinitas ligan terhadap protein target yang dihitung dari binding energy menggunakan persamaan termodinamika	Perhitungan menggunakan rumus: $Ki = \exp(\Delta G / RT)$ $R = 1.987\times10^{-3}$ kcal/mol·K $T = 298.15$ K (25°C)	Numerik (Rasio)	Nilai Ki dalam satuan µM atau nM; semakin kecil nilai Ki maka semakin kuat afinitas pengikatan dan potensi inhibisi
Jenis Interaksi Molekuler	Tipe interaksi yang terbentuk antara ligan (tokotrienol) dan residu asam amino protein target (MMP-2 atau MMP-9) pada situs pengikatan	Visualisasi dan analisis menggunakan *software* Discovery Studio Visualizer, PyMOL, atau BIOVIA Discovery Studio	Kategorik (Nominal)	Jenis interaksi: • Ikatan hidrogen • Interaksi hidrofobik • Interaksi elektrostatik • π-π stacking • Van der Waals

3.2 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Desain dari penelitian ini adalah *experimental laboratory* untuk uji aktivitas antioksidan dan *in silico study* untuk analisis *molecular docking*. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) untuk menentukan persentase inhibisi dan nilai IC_{50} dari ekstrak tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Analisis *molecular docking* antara senyawa α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol dengan protein target MMP-2 (Gelatinase A) dan MMP-9 (Gelatinase B) untuk menganalisis *binding energy*, konstanta inhibisi (Ki), dan jenis interaksi molekuler yang terbentuk.

3.3 Waktu dan tempat penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan selama 6 bulan bulan, terhitung

sejak Juni hingga November 2025.

Tabel 3.2 Waktu Penelitian

No.	kegiatan	Juni 2025	Juli 2025	Agus 2025	Septem 2025	Okt 2025	Nov 2025
1.	S t u d i literature						
2.	Penyusunan proposal						
3.	S e m i n a r proposal						
4.	Pelaksanaan riset						
5.	A n a l i s i s data						
6.	Penyusunan laporan						

3.3.2 Tempat Penelitian

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan Analisis *molecular docking* dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini terdiri dari seluruh buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) yang tumbuh di Kabupaten Pelalawan, Riau untuk uji aktivitas antioksidan metode DPPH, serta seluruh struktur protein MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2) dan MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase-9*) yang tersedia pada *database Protein Data Bank* (PDB) dan seluruh struktur senyawa α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol yang tersedia pada *database PubChem* untuk uji *molecular docking*.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan metode DPPH adalah buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) yang diperoleh dari Kabupaten Pelalawan, Riau yang kemudian diekstraksi untuk mendapatkan fraksi tokotrienol. Ekstrak yang diperoleh mengandung campuran α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol yang diuji pada konsentrasi 150, 300, 450, dan 600 ppm dengan kontrol positif menggunakan asam askorbat.

Kriteria inklusi untuk sampel buah kelapa sawit meliputi:

- Buah kelapa sawit yang matang sempurna dengan kriteria warna merah jingga

- Buah dalam kondisi segar dan tidak busuk
- Buah berasal dari pohon yang sehat dan produktif. Kriteria eksklusi meliputi:
- Buah yang mengalami kerusakan fisik atau pembusukan
- Buah yang terlalu muda atau terlalu tua
- Buah yang terkontaminasi pestisida atau bahan kimia lainnya.

Sampel yang digunakan untuk uji *molecular docking* adalah struktur protein target MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2/Gelatinase A) dan MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9/Gelatinase B) yang diperoleh dari *database Protein Data Bank* (PDB) di situs https://www.rcsb.org/, serta struktur senyawa ligan α-tokotrienol (PubChem CID: 5282347), β-tokotrienol (PubChem CID: 5282348), γ-tokotrienol (PubChem CID: 5282349), dan δ-tokotrienol (PubChem CID: 5282350) yang diperoleh dari *database PubChem* di situs https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/.

Kriteria inklusi untuk struktur protein meliputi:

- Resolusi struktur < 3 Ångström (Å)
- Struktur protein dengan tahun publikasi terbaru diutamakan
- Memiliki ligan ko-kristal untuk validasi metode *docking*
- Tidak terdapat mutasi pada protein target Kriteria eksklusi untuk struktur protein meliputi:
- Resolusi > 3 Å,
- Terdapat mutasi pada protein target
- Struktur protein yang tidak lengkap atau memiliki *missing residues* signifikan pada situs aktif. Kriteria inklusi untuk struktur senyawa ligan meliputi:
- Struktur tersedia dalam format 3D pada *database pubchem*
- Memiliki informasi identitas kimia yang lengkap
- Dapat dikonversi ke format PDBQT untuk proses *docking*. Kriteria eksklusi untuk struktur senyawa ligan meliputi:
- Struktur tidak tersedia dalam format 3D
- Struktur memiliki kesalahan dalam penggambaran struktur kimia.

3.5 Alat dan Bahan yang digunakan

3.5.1 Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan metode DPPH meliputi bejana maserasi, botol gelap, cawan porselin, corong Buchner, *rotary evaporator*, gelas Erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, mikropipet, pipet volume, *vial*, spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, *water bath*, dan *aluminium foil*. Alat yang digunakan untuk uji *molecular docking* adalah perangkat komputer dengan spesifikasi minimal *processor* Intel Core i5 atau AMD Ryzen 5, RAM 8 GB, *Hard Disk* 500 GB, sistem operasi Windows 10, serta koneksi internet untuk mengakses *database* PDB dan PubChem.

3.5.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan metode DPPH meliputi buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dari Kabupaten Pelalawan, Riau, *methanol* p.a (Merck), etanol 96%, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich), asam askorbat (vitamin C) sebagai kontrol positif, aquadest, dan kertas saring Whatman No. 42. Bahan yang digunakan untuk uji *molecular docking* meliputi struktur protein MMP-2 dan MMP-9 dari *Protein Data Bank* (https://www.rcsb.org/) serta struktur senyawa α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol dari *PubChem* (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). *Software* yang digunakan untuk analisis *molecular docking* meliputi PyRx 0.8 atau AutoDock Vina 1.2.0 untuk proses *docking*, Open Babel 3.1.1 untuk konversi format file, PyMOL 2.5 atau Discovery Studio Visualizer 2021 untuk preparasi protein dan visualisasi hasil *docking*, BIOVIA Discovery Studio 2021 untuk analisis interaksi molekuler, dan ChemDraw atau MarvinSketch untuk menggambar struktur kimia.

3.6 Teknik Pengumpulan Data

3.6.1 Pengambilan sampel

Sampel buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) diambil dari perkebunan kelapa sawit di Kabupaten Pelalawan, Riau. Buah kelapa sawit yang dipilih adalah buah yang telah matang sempurna dengan kriteria warna

merah jingga dan dalam kondisi segar. Sampel buah diambil secara acak dari beberapa pohon yang berbeda untuk memastikan representasi yang baik.

3.6.2 Pengolahan sampel

Mesokarp dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, kemudian dipotong kecil-kecil dengan ukuran ±2 cm. Potongan mesokarp dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40-50°C selama 24-48 jam atau hingga kadar air mencapai <10%. Mesokarp kering kemudian dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan mesh 40 untuk mendapatkan ukuran partikel yang homogen.

3.6.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi. Serbuk mesokarp kelapa sawit sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan ditambahkan pelarut *methanol* dengan perbandingan 1:10 (w/v) atau 1 liter *methanol*. Campuran dimaserasi selama 3 × 24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan sesekali menggunakan batang pengaduk. Setiap 24 jam, filtrat disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 42 dan residu diremaserasi dengan pelarut *methanol* baru. Filtrat yang diperoleh dari tiga kali maserasi digabungkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C dan tekanan vakum hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan di atas *water bath* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kering dan ditimbang untuk menghitung rendemen ekstrak.[81,82]

Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus:

Rendemen (%) = (Berat ekstrak kering / Berat simplisia awal) × 100%

3.6.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan menimbang 18 mg DPPH dan dilarutkan dalam *methanol* p.a hingga volume 300 mL dalam labu ukur (konsentrasi ~60 µg/mL atau 0,15 mM). Larutan DPPH disimpan dalam

botol gelap yang dilapisi aluminium foil dan digunakan segera atau disimpan pada suhu 4°C maksimal 24 jam. Sebelum digunakan, larutan DPPH dihomogenisasi terlebih dahulu.[83]

2. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak (Larutan Induk)

Ekstrak kering tokotrienol minyak sawit ditimbang sebanyak 10 mg menggunakan timbangan analitik dan dilarutkan dalam DMSO 100% sebanyak 1 mL dalam *vial* sehingga konsentrasi larutan stok adalah 10.000 ppm[11]. DMSO digunakan untuk meningkatkan kelarutan ekstrak. Larutan dihomogenisasi menggunakan *vortex mixer* selama 1-2 menit hingga ekstrak larut sempurna.[83]

3. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Uji

Dari larutan induk (10.000 ppm), dibuat seri konsentrasi: 150, 300, 450, dan 600 ppm dengan cara pengenceran menggunakan *methanol* p.a atau etanol 96% dan rumus $V_1M_1 = V_2M_2$[1].[83] Perhitungan volume dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3.3 Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Tokotrienol

Konsentrasi (ppm)	Larutan Ekstrak Induk (µL)	Methanol/Etanol (µL)	Volume Total (mL)
150 ppm	450	29.550	30
300 ppm	900	29.100	30
450 ppm	1.350	28.650	30
600 ppm	1.800	28.200	30

4. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 3000 µL (3 mL) *methanol* atau etanol p.a dicampurkan dengan 300 µL larutan DPPH dalam *vial* gelap. Larutan ini digunakan sebagai kontrol untuk mengukur absorbansi maksimum DPPH tanpa antioksidan (A_0).[83]

5. Pembuatan Larutan Kontrol Positif (Vitamin C/Asam Askorbat)

Asam askorbat (vitamin C) ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam DMSO 100% sebanyak 1 mL, kemudian dihomogenisasi menggunakan *vortex* sehingga diperoleh larutan vitamin C dengan konsentrasi 10.000 ppm. Dari larutan induk 10.000 ppm, dibuat larutan antara 100 ppm dengan mengambil 100 µL larutan induk dan menambahkan 9.900 µL *methanol* (total 10 mL). Dari larutan

100 ppm, dibuat seri konsentrasi: 2, 4, 6, dan 8 ppm untuk kontrol positif.[83]

Tabel 3.4 Pembuatan Larutan Seri Kontrol Positif (Vitamin C)

Konsentrasi (ppm)	Larutan Vit C 100 ppm (µL)	Methanol/Etanol (µL)	Volume Total (mL)
2 ppm	600	29.400	30
4 ppm	1.200	28.800	30
6 ppm	1.800	28.200	30
8 ppm	2.400	27.600	30

6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 3000 µL (3 mL) larutan sampel dengan berbagai konsentrasi dicampurkan dengan 300 µL larutan DPPH dalam *vial* gelap atau tabung reaksi yang dilapisi aluminium foil. Campuran dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu ruang (25-27°C) dalam kondisi gelap selama 30 menit. Setelah inkubasi, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Pengukuran dilakukan dengan memasukkan larutan ke dalam kuvet, kemudian dibaca absorbansinya. Sebagai blanko, digunakan *methanol* atau etanol murni. Setiap pengujian dilakukan dalam triplo (tiga kali pengulangan) untuk memastikan konsistensi hasil.[83]

7. Perhitungan Persentase Inhibisi

Persentase inhibisi radikal DPPH dihitung menggunakan rumus:

% Inhibisi = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$ Keterangan:

- A_0 = Absorbansi kontrol negatif (DPPH + methanol tanpa sampel)
- A_1 = Absorbansi sampel uji (DPPH + ekstrak atau kontrol positif)

8. Penentuan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} (konsentrasi yang menghambat 50% radikal DPPH) ditentukan dengan membuat kurva regresi linear antara konsentrasi sampel (sumbu x) dengan persentase inhibisi (sumbu y) menggunakan Microsoft Excel. Persamaan regresi linear yang diperoleh adalah:[83] **y = ax + b**

Keterangan:

- y = % inhibisi
- x = konsentrasi (ppm)
- a = *slope* (kemiringan)
- b = *intercept* (konstanta)

Untuk mendapatkan nilai IC_{50}, substitusikan y = 50 ke dalam persamaan regresi:

50 = ax + b

IC_{50} (x) = (50 - b) / a

9. Interpretasi Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan diklasifikasikan berdasarkan nilai IC_{50} menurut kriteria Phongpaichit et al.:[84]

- **Sangat kuat:** IC_{50} < 50 µg/mL (atau <50 ppm)
- **Kuat:** IC_{50} 50-100 µg/mL
- **Sedang:** IC_{50} 100-200 µg/mL
- **Lemah:** IC_{50} > 200 µg/mL

3.6.5 Uji Molecular Docking

A. Pencarian dan Preparasi Struktur Protein Target

1. Pencarian Struktur Protein di Protein Data Bank (PDB)

Struktur tiga dimensi (3D) protein MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2) dan MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) diunduh dari *database Protein Data Bank* (PDB) melalui situs https://www.rcsb.org/[25]. Pencarian dilakukan dengan memasukkan kata kunci "MMP-2" atau "MMP-9" pada kolom pencarian di halaman utama PDB. Struktur protein dipilih berdasarkan beberapa kriteria kualitas, yaitu: resolusi kristalografi < 3 Ångström (Å), memiliki ligan ko-kristal yang dapat digunakan untuk validasi metode *docking*, tahun publikasi terbaru untuk memastikan akurasi data struktural, dan tidak memiliki mutasi pada sekuens protein.[84]

Berdasarkan kriteria tersebut, struktur protein yang dipilih adalah:

- **MMP-2:** PDB ID **1HOV** dengan resolusi 2.30 Å
- **MMP-9:** PDB ID **1GKC** dengan resolusi 2.30 Å

Struktur protein diunduh dalam format file *.pdb* (Protein Data Bank format) dengan cara mengklik tombol "Download Files" pada halaman detail struktur protein, kemudian memilih opsi "PDB Format".

2. Preparasi Struktur Protein

Struktur protein yang telah diunduh dibuka menggunakan *software* PyMOL atau Discovery Studio Visualizer untuk dilakukan preparasi sebelum proses *docking*. Preparasi struktur protein meliputi beberapa

tahapan penting sebagai berikut:[85,86]

a. Penghapusan Molekul Air (*Water Removal*)

Molekul air (H_2O) yang tidak berperan penting dalam pengikatan ligan dihapus dari struktur protein menggunakan perintah "*remove solvent*" pada PyMOL[3]. Penghapusan molekul air ini bertujuan untuk mengurangi kompleksitas struktur dan mempercepat proses *docking* tanpa mengurangi akurasi hasil.[86]

b. Identifikasi dan Penghapusan Ligan Ko-kristal

Ligan ko-kristal yang terikat pada protein diidentifikasi terlebih dahulu untuk menentukan lokasi situs aktif. Koordinat pusat ligan ko-kristal (nilai x, y, z) dicatat karena akan digunakan sebagai referensi untuk menentukan posisi *grid box* pada proses *docking*. Setelah koordinat dicatat, ligan ko-kristal dan ion logam yang tidak diperlukan dapat dihapus dari struktur.[86]

c. Penambahan Atom Hidrogen

Atom hidrogen polar ditambahkan pada struktur protein menggunakan PyMOL atau AutoDockTools dengan perintah "*add polar hydrogens*" atau "*h_add*"[32]. Penambahan atom hidrogen penting untuk perhitungan interaksi ikatan hidrogen antara ligan dan protein selama proses *docking*.[85]

d. Optimasi Struktur Protein

Struktur protein dioptimasi untuk memperbaiki geometri dan menghilangkan bentrokan atom (*steric clashes*) menggunakan metode *energy minimization* pada Discovery Studio atau software sejenis. Optimasi struktur memastikan konformasi protein dalam keadaan energi stabil sebelum proses *docking* dilakukan.

e. Konversi Format File

Struktur protein yang telah dipreparasi disimpan dalam format *.pdb* atau dikonversi ke format *.pdbqt* (Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)) menggunakan AutoDockTools atau Open Babel. Format PDBQT diperlukan oleh AutoDock Vina untuk proses *docking* karena format ini mengandung informasi muatan atom (*atomic charges*) dan tipe

atom yang diperlukan untuk perhitungan energi interaksi.[85]

3. Penentuan Situs Aktif (*Binding Site*)

Situs aktif atau tempat pengikatan ligan (*binding site*) ditentukan berdasarkan lokasi ligan ko-kristal pada struktur protein. Koordinat pusat situs aktif dalam bentuk koordinat Kartesian (x, y, z) dicatat dengan teliti dan akan digunakan untuk menentukan posisi dan ukuran *grid box* pada proses *docking*. Ukuran *grid box* ditentukan cukup besar, biasanya berkisar antara 20-30 Ångström pada setiap dimensi, untuk memastikan seluruh area situs aktif tercakup dalam ruang pencarian *docking*.[85]

B. Pencarian dan Preparasi Struktur Senyawa Ligan (Tokotrienol)

1. Pencarian Struktur Senyawa di PubChem

Struktur dua dimensi (2D) dan tiga dimensi (3D) dari empat isomer tokotrienol (α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol) diunduh dari *database PubChem* melalui situs https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/[38]. Pencarian dilakukan dengan memasukkan nama senyawa (misalnya "alpha-tocotrienol") atau langsung memasukkan nomor identifikasi senyawa (CID) pada kolom pencarian.

Nomor CID (*Compound Identification*) untuk masing-masing isomer tokotrienol adalah:

- **α-Tokotrienol:** CID 5282347
- **β-Tokotrienol:** CID 5282348
- **γ-Tokotrienol:** CID 5282349
- **δ-Tokotrienol:** CID 5282350

Struktur senyawa diunduh dalam format *.sdf* (*Structure Data File*) yang berisi informasi struktur 3D lengkap dengan koordinat atom.[79] Pengunduhan dilakukan dengan mengklik tombol "Download" pada bagian "3D Conformer" di halaman detail senyawa, kemudian memilih format SDF.

2. Preparasi Struktur Ligan

Struktur ligan yang telah diunduh dibuka menggunakan *software* PyMOL, ChemDraw, atau MarvinSketch untuk dilakukan preparasi.

Preparasi struktur ligan meliputi beberapa tahapan sebagai berikut:[86]

a. Optimasi Geometri

Struktur 3D ligan dioptimasi menggunakan metode *energy minimization* dengan *force field* MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) atau UFF (*Universal Force Field*) untuk mendapatkan konformasi dengan energi terendah (konformasi paling stabil). Optimasi geometri memastikan struktur ligan dalam keadaan yang paling mungkin secara kimia dan energetika.

b. Penambahan Atom Hidrogen

Jika struktur ligan yang diunduh belum memiliki atom hidrogen secara eksplisit, maka atom hidrogen ditambahkan menggunakan *software* preparasi molekul. Penambahan hidrogen penting untuk perhitungan interaksi yang akurat selama proses *docking*.

c. Konversi Format File

Struktur ligan dikonversi dari format *.sdf* ke format *.pdbqt* menggunakan Open Babel atau AutoDockTools. Konversi menggunakan Open Babel dapat dilakukan melalui *command line* dengan perintah:[85]

obabel -isdf input.sdf -opdbqt output.pdbqt -h

Parameter *-h* digunakan untuk menambahkan atom hidrogen secara otomatis selama proses konversi. Format PDBQT diperlukan karena mengandung informasi muatan Gasteiger dan definisi ikatan yang dapat berotasi (*rotatable bonds*) yang diperlukan oleh AutoDock Vina.[85]

d. Pengaturan *Torsion* (Ikatan yang Dapat Berotasi)

Ikatan yang dapat berotasi (*rotatable bonds*) pada struktur ligan dideteksi dan diatur agar fleksibel selama proses *docking*. Fleksibilitas ligan memungkinkan eksplorasi berbagai konformasi ligan dalam situs aktif protein untuk menemukan pose pengikatan yang optimal.[85]

C. Validasi Metode *Docking* (*Re-docking*)

Sebelum melakukan *docking* terhadap senyawa uji (tokotrienol), dilakukan validasi metode *docking* melalui prosedur *re-docking* ligan ko-kristal. Validasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa parameter *docking* yang digunakan dapat memprediksi pose pengikatan ligan dengan akurat.[87]

Prosedur *re-docking* dilakukan dengan cara meng-*docking* kembali ligan ko-kristal yang telah dihapus dari struktur protein ke dalam situs aktif protein yang sama menggunakan parameter *docking* yang identik dengan yang akan digunakan untuk senyawa uji. Posisi ligan hasil *re-docking* kemudian dibandingkan dengan posisi ligan ko-kristal pada struktur kristalografi menggunakan nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Metode *docking* dianggap valid dan dapat diterima jika nilai RMSD ≤ 2.0 Ångström. Nilai RMSD yang rendah menunjukkan bahwa metode *docking* mampu mereproduksi pose pengikatan ligan dengan akurat, sehingga dapat dipercaya untuk memprediksi pengikatan senyawa uji.

D. *Molecular Docking* Menggunakan AutoDock Vina

1. Pengaturan Parameter *Docking*

Proses *molecular docking* dilakukan menggunakan *software* AutoDock Vina yang diakses melalui antarmuka grafis PyRx untuk memudahkan pengaturan parameter. Parameter *docking* yang digunakan meliputi:[85]

- **Pusat *Grid Box* (*Center*):** Koordinat x, y, dan z yang sesuai dengan pusat situs aktif protein yang telah ditentukan berdasarkan lokasi ligan ko-kristal
- **Ukuran *Grid Box* (*Size*):** Dimensi kotak pencarian sebesar 25 Å × 25 Å × 25 Å (dapat disesuaikan tergantung ukuran situs aktif)
- ***Exhaustiveness*:** Nilai 8, yang menentukan tingkat ketelitian dan kecermatan pencarian konformasi ligan (*default* = 8; nilai lebih tinggi meningkatkan akurasi tetapi memperlama waktu komputasi)
- **Jumlah *Mode*:** 9 konformasi ligan (*binding pose*) yang akan dihasilkan dari proses *docking*[52]
- ***Energy Range*:** 3 kcal/mol, yaitu rentang energi maksimal untuk konformasi yang akan disimpan relatif terhadap konformasi terbaik[53]

2. Proses *Docking*

File protein dalam format *.pdbqt* dan file ligan dalam format *.pdbqt* dimasukkan ke dalam *software* PyRx atau AutoDock Vina[54]. Setelah semua parameter dikonfigurasi dengan benar, proses *docking* dijalankan dengan

mengklik tombol "Run Vina" atau "Start Docking". Proses *docking* akan menghasilkan beberapa konformasi ligan (*binding poses*) yang masing-masing memiliki nilai *binding energy* (ΔG) dalam satuan kcal/mol.[88]

Konformasi dengan nilai *binding energy* paling negatif (nilai energi paling rendah) dipilih sebagai konformasi terbaik karena menunjukkan afinitas pengikatan yang paling kuat antara ligan dan protein. Hasil *docking* untuk setiap konformasi juga mencakup informasi RMSD terhadap konformasi terbaik sebagai indikator keragaman pose yang dihasilkan.

3. Export Hasil *Docking*

Setelah proses *docking* selesai dan konformasi terbaik telah diidentifikasi, hasil *docking* perlu disimpan untuk analisis lebih lanjut. Konformasi terbaik (biasanya Mode 1) di-*export* dengan cara mengklik kanan pada hasil *docking* di panel PyRx, kemudian memilih opsi "Export" atau "Save". File hasil *docking* disimpan dalam format *.pdbqt* dengan penamaan yang sistematis untuk memudahkan identifikasi, misalnya: alpha_tocotrienol_1HOV_result.pdbqt untuk hasil *docking* α-tokotrienol terhadap protein MMP-2 (PDB ID: 1HOV).[88]

4. Pengulangan Proses untuk Semua Kombinasi Ligan-Protein

Proses *molecular docking* dilakukan terhadap seluruh kombinasi ligan dan protein target yang digunakan dalam penelitian. Empat isoform tokotrienol, yaitu **α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol**, masing-masing diinteraksikan dengan dua protein target, yaitu **Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2; PDB ID: 1HOV)** dan **Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9; PDB ID: 1GKC)**. Dengan demikian, terdapat **delapan kombinasi** ligan–protein yang dianalisis, yaitu:

1. α-Tokotrienol – MMP-2 (PDB ID: 1HOV)
2. α-Tokotrienol – MMP-9 (PDB ID: 1GKC)
3. β-Tokotrienol – MMP-2 (PDB ID: 1HOV)
4. β-Tokotrienol – MMP-9 (PDB ID: 1GKC)
5. γ-Tokotrienol – MMP-2 (PDB ID: 1HOV)
6. γ-Tokotrienol – MMP-9 (PDB ID: 1GKC)
7. δ-Tokotrienol – MMP-2 (PDB ID: 1HOV)

8. δ-Tokotrienol – MMP-9 (PDB ID: 1GKC)

Seluruh proses *docking* dilakukan menggunakan parameter dan kondisi simulasi yang sama pada setiap pasangan ligan–protein. Penerapan parameter yang seragam bertujuan untuk meminimalkan variasi teknis selama simulasi, sehingga hasil yang diperoleh dapat dibandingkan secara objektif dan memiliki tingkat konsistensi yang tinggi antar seluruh kombinasi yang diuji

5. Perhitungan Konstanta Inhibisi (Ki)

Nilai konstanta inhibisi (Ki) merupakan parameter penting yang menunjukkan kekuatan afinitas pengikatan ligan terhadap protein target dan potensinya sebagai inhibitor. Nilai Ki dihitung dari nilai *binding energy* (ΔG) yang diperoleh dari hasil *docking* menggunakan persamaan termodinamika sebagai berikut:[89]

Ki = exp(ΔG / RT) Keterangan:

- Ki = Konstanta inhibisi (dalam satuan Molar, M)
- ΔG = *Binding energy* atau energi pengikatan dari hasil *docking* (dalam satuan kcal/mol)
- R = Konstanta gas ideal = 1.987×10^{-3} kcal/(mol·K)
- T = Temperatur absolut = 298.15 K (setara dengan 25°C atau suhu ruang)
- exp = Fungsi eksponensial (e^x)

Contoh Perhitungan:

Jika hasil *docking* α-tokotrienol terhadap MMP-2 menghasilkan nilai

binding energy (ΔG) = -8.5 kcal/mol, maka perhitungan nilai Ki adalah: Ki

= exp(-8.5 / ($1.987 \times 10^{-3} \times 298.15$))

Ki = exp(-8.5 / 0.592) Ki = exp(-14.36)

Ki = 5.92×10^{-7} M

Ki = 0.592 µM (mikromolar)

Nilai Ki yang lebih kecil menunjukkan afinitas pengikatan yang lebih kuat dan potensi inhibisi yang lebih tinggi terhadap enzim target. Nilai Ki dalam rentang mikromolar (µM) atau nanomolar (nM) umumnya

mengindikasikan potensi inhibisi yang baik.[89]

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

3.7.1.1 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Penentuan nilai IC_{50} dilakukan melalui analisis regresi linear berdasarkan hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase inhibisi yang diperoleh. Persamaan regresi linear dinyatakan dalam bentuk y = ax + b, kemudian nilai y = 50% disubstitusikan ke dalam persamaan tersebut untuk memperoleh konsentrasi yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas.

Selanjutnya, aktivitas antioksidan diklasifikasikan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh. Senyawa dengan nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm dikategorikan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat, nilai 50–100 ppm termasuk kategori kuat, nilai 100–200 ppm diklasifikasikan sebagai sedang, sedangkan nilai lebih dari 200 ppm menunjukkan aktivitas antioksidan lemah.[77]

3.7.1.2 Uji Molecular Docking

Data hasil simulasi *molecular docking* yang diperoleh dari *AutoDock Vina* dianalisis dengan mengekstraksi informasi binding energy (ΔG) dalam satuan kcal/mol menggunakan aplikasi penyunting teks, seperti *Notepad*. Selanjutnya, nilai *konstanta inhibisi (Ki)* dihitung berdasarkan persamaan termodinamika untuk menggambarkan kekuatan afinitas antara ligan dan protein target.

Analisis interaksi molekuler dilakukan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* dan *PyMOL*. Kedua aplikasi tersebut digunakan untuk memvisualisasikan kompleks ligan–protein serta mengidentifikasi jenis interaksi yang terbentuk, meliputi *ikatan hidrogen (hydrogen bond)**,** interaksi hidrofobik**,** interaksi elektrostatik**,** π–π stacking**,* ***dan*** *gaya Van der Waals*. Selain itu, residu asam amino yang berperan dalam proses pengikatan juga dianalisis untuk mengetahui karakteristik interaksi pada masing-masing kompleks.

Seluruh hasil analisis kemudian disusun dalam bentuk tabel sehingga memudahkan perbandingan nilai afinitas pengikatan dan pola interaksi molekuler antara keempat isoform tokotrienol (α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol) terhadap dua

protein target, yaitu *Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)* dan *Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9).* Perbandingan tersebut digunakan untuk mengidentifikasi isoform tokotrienol yang memiliki potensi pengikatan paling kuat terhadap masing-masing protein target.

3.7.2 Analisis Data

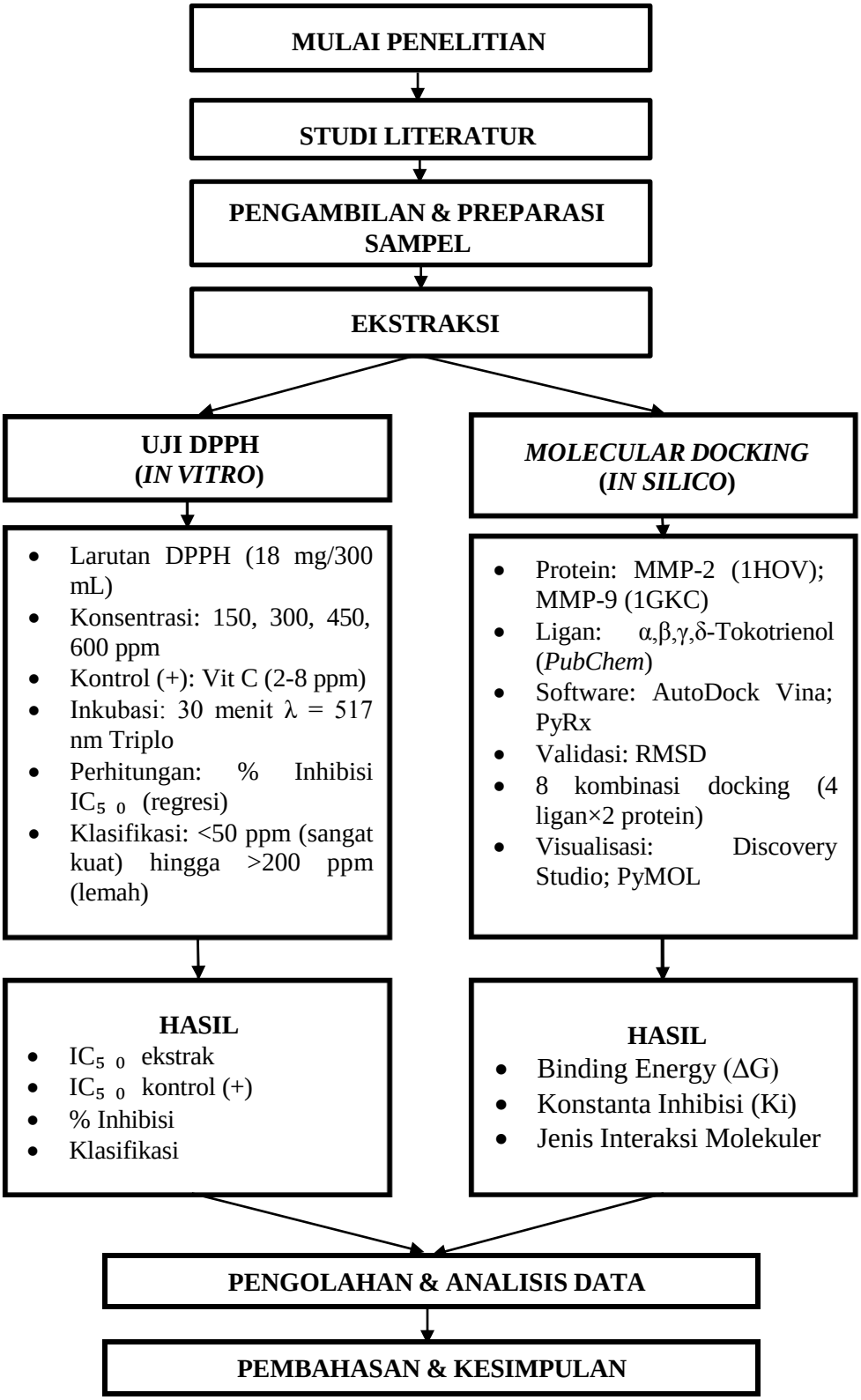
3.7.2.1 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Hasil uji DPPH dianalisis secara deskriptif dengan mengevaluasi nilai IC_{50} ekstrak tokotrienol dan membandingkannya dengan kontrol positif (asam askorbat). Analisis komparatif dilakukan untuk menilai potensi antioksidan relatif ekstrak tokotrienol. Hubungan dosis-respons dievaluasi berdasarkan persentase inhibisi pada berbagai konsentrasi uji.

3.7.2.2 Uji Molecular Docking

Hasil *molecular docking* dianalisis berdasarkan nilai *binding energy* dan konstanta inhibisi (Ki) untuk menentukan afinitas pengikatan ligan terhadap protein target. Klasifikasi afinitas dilakukan berdasarkan nilai *binding energy* (sangat kuat: <-10.0 kcal/mol; kuat: -10.0 hingga -7.5 kcal/mol; sedang: -7.5 hingga -5.0 kcal/mol; lemah: >-5.0 kcal/mol). Analisis komparatif dilakukan untuk membandingkan afinitas pengikatan keempat isomer tokotrienol (α-, β-, γ-, δ-) terhadap MMP-2 dan MMP-9. Interaksi molekuler dianalisis untuk mengidentifikasi residu asam amino penting pada situs aktif dan mengevaluasi mekanisme inhibisi. Selektivitas pengikatan terhadap MMP-2 versus MMP-9 juga dievaluasi untuk menilai spesifisitas ligan.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Hasil Karakteristik Bahan Uji

Penelitian ini menggunakan Crude Palm Oil (CPO) siap pakai sebagai bahan uji sehingga tahapan ekstraksi minyak dari buah kelapa sawit tidak dilakukan. Penggunaan CPO siap pakai bertujuan agar penelitian difokuskan pada analisis potensi antioksidan senyawa tokotrienol melalui pendekatan *molecular docking* terhadap protein target MMP (*Matrix Metalloproteinase*) serta pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Oleh karena itu, pada penelitian ini tidak diperoleh data rendemen ekstraksi maupun karakterisasi hasil ekstraksi.

4.1.2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit Metode DPPH IC_{50}

Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap minyak buah kelapa sawit menggunakan metode DPPH (1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan pada empat tingkat konsentrasi yaitu 150, 300, 450, dan 600 ppm dengan asam askorbat (vitamin C) sebagai kontrol positif. Hasil pengukuran absorbansi dan perhitungan persentase inhibisi disajikan dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Absorbansi CPO dengan Metode DPPH

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (A_1)	A_0 (Kontrol)	Inhibisi %
150	0,4219	0,1498	-181,71%
300	0,1397	0,1611	13,28%
450	0,2356	0,1711	-37,70%
600	0,1514	0,1582	4,30%

Nilai IC_{50} CPO = 672,25 ppm

Keterangan:
A_0 = absorbansi kontrol negatif (DPPH + metanol tanpa sampel);
A_1 = absorbansi sampel uji;

% inhibisi = (A0−A1)/A0×100%(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%(A0−A1)/A0 ×100%;
IC_{50} = konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH.

Berdasarkan data persentase inhibisi pada Tabel 4.1, nilai IC_{50} dapat ditentukan menggunakan persamaan regresi linear antara konsentrasi sampel dan persentase inhibisi. Hasil analisis diperoleh persamaan regresi:

$$y = 0{,}388x - 177{,}22$$

y = persentase inhibisi (%)

- x = konsentrasi sampel (ppm)

Nilai IC_{50} diperoleh ketika persentase inhibisi sebesar 50%, sehingga:

$$50 = 0{,}338x - 177{,}22$$

Maka diperoleh nilai:

$IC_{50} = 672{,}25$ ppm

Berdasarkan Tabel 4.1, hasil uji aktivitas antioksidan CPO menggunakan metode DPPH menunjukkan nilai persentase inhibisi yang berbeda pada setiap variasi konsentrasi sampel. Data persentase inhibisi tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan regresi linear antara konsentrasi sampel (x) dan persentase inhibisi (y) untuk menentukan nilai IC_{50}. Hasil analisis menghasilkan persamaan regresi linear yang digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal bebas DPPH. Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai IC_{50} CPO sebesar 672,25 ppm. Nilai tersebut menunjukkan konsentrasi CPO yang diperlukan untuk menghasilkan persentase inhibisi sebesar 50% terhadap radikal bebas DPPH.

Selain itu, hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai persentase inhibisi pada setiap konsentrasi sampel tidak seluruhnya mengalami peningkatan. Pada konsentrasi 150 ppm dan 450 ppm diperoleh nilai persentase inhibisi negatif, yaitu masing-masing sebesar -181,71% dan -37,70%, yang menunjukkan bahwa nilai absorbansi sampel (A1) lebih tinggi dibandingkan dengan nilai absorbansi kontrol (A0). Sementara itu, pada konsentrasi lainnya diperoleh nilai persentase inhibisi positif dengan besaran yang bervariasi. Secara keseluruhan, data pada Tabel 4.1

menunjukkan hasil pengujian aktivitas antioksidan CPO berdasarkan nilai persentase inhibisi pada setiap konsentrasi serta nilai IC_{50} yang diperoleh dari analisis regresi linear.

Tabel 4.2 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Kontrol Positif (Asam Askorbat) dengan Metode DPPH

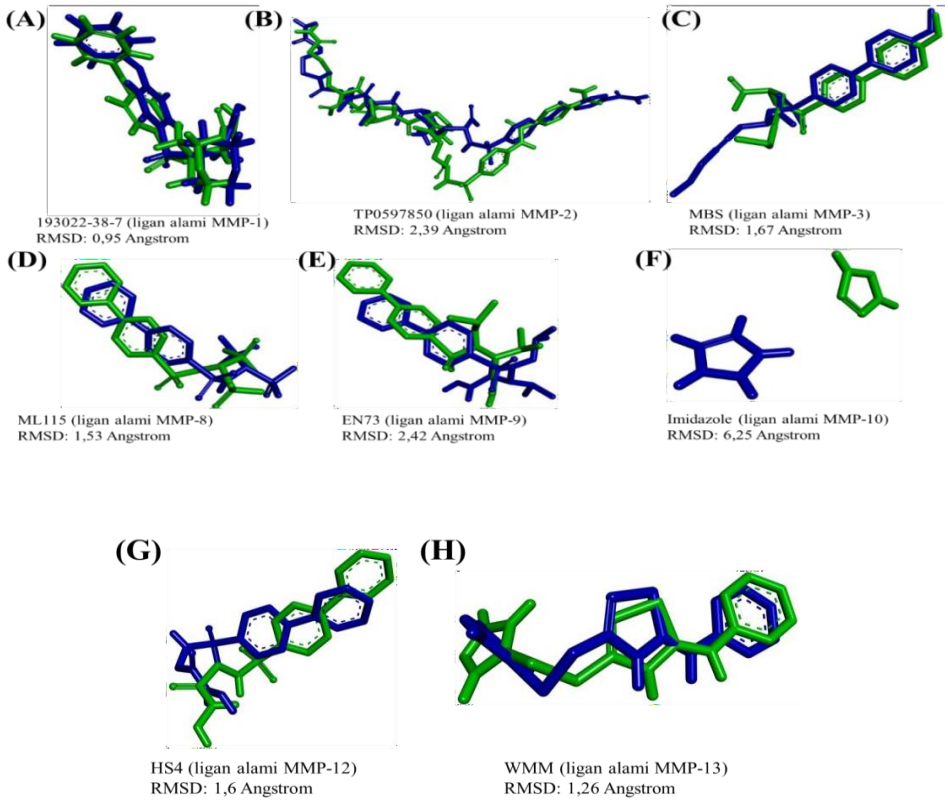
Konsentrasi (ppm)	**Absorbansi (A_1)**	**A_0 (Kontrol)**	**Inhibisi %**
2	0,0524	0,1498	65,02 **%**
4	0,0512	0,1611	68,22 **%**
6	0,0515	0,1711	69,90 **%**
8	0,0520	0,1582	67,13 **%**

Keterangan: A_0 = absorbansi kontrol negatif; A_1 = absorbansi sampel. Asam askorbat menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan % inhibisi berkisar 65,02% - 69,90%.

Hasil pengujian kontrol positif (asam askorbat) yang disajikan pada Tabel 4.2 menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dan konsisten dengan persentase inhibisi berkisar antara 65,02% hingga 69,90% pada rentang konsentrasi 2-8 ppm. Konsistensi hasil ini mengindikasikan bahwa metode DPPH yang digunakan berfungsi dengan baik dan dapat mendeteksi aktivitas antioksidan dengan sensitif pada senyawa antioksidan standar. Nilai persentase inhibisi yang tinggi pada konsentrasi yang sangat rendah (2-8 ppm) menunjukkan bahwa asam askorbat memiliki kapasitas antioksidan yang jauh lebih superior dibandingkan CPO.

4.1.3. Validasi Metode *Molecular Docking,* Matriks *Metalloproteinase* (MMP) dan Vitamin C

Pada penelitian ini, digunakan 10 jenis struktur protein matriks *metalloproteinase* (MMP) yang dimana terdapat ligan alami sebagai kontrol validasi. Validasi *docking* menunjukkan bahwa dari 8 ligan alami yang didocking ulang, 7 diantaranya dapat bersuperimposisi dengan posisi awalnya dengan kurang dari 3 angstrom perbedaan jaraknya atau *Root Mean Square Deviation* (RMSD)



Gambar 4.1 Visualisasi validasi docking ligan alami struktur protein **(A)** MMP-1,**(B)** MMP-2, **(C)** MMP-3, **(D)** MMP-8, **(E)** MMP-9, **(F)** MMP-10, **(G)** MMP-12,dan **(H)** MMP-13. Struktur ligan berwarna biru tua adalah posisi struktur sebelum didocking, sementara strutkru yang berwarna hijau adalah posisi struktur ligan setelah didocking.

Pada Gambar 4.1 diatas hasil ini menunjukkan tingkat akurasi metode *docking* yang sangat baik, karena nilai RMSD < 3 Å mengindikasikan bahwa posisi ligan hasil prediksi hampir identik dengan posisi ligan pada struktur kristal aslinya.

Keberhasilan validasi ini memiliki arti bahwa metode dan parameter *docking* yang digunakan dalam penelitian ini mampu mereproduksi ikatan ligan-protein dengan akurat. Dengan kata lain, metode ini dapat dipercaya untuk memprediksi bagaimana tokotrienol akan berikatan dengan struktur MMP. Tingkat keberhasilan 87,5% (7 dari 8 ligan) menunjukkan konsistensi yang tinggi, sehingga hasil prediksi ikatan tokotrienol terhadap MMP dapat dianggap valid dan reliabel untuk analisis lebih lanjut.

4.1.4. Prediksi Ikatan Afinitas Tokotrienol terhadap Struktur MMP

Tokotrienol memiliki kemampuan sebagai senyawa yang menjanjikan dalam menghambat protein MMP dengan nilai binding energy yang bervariasi mulai dari −5,58 kkal/mol hingga −12,88 kkal/mol. Nilai binding energy yang negatif menunjukkan bahwa proses pengikatan berlangsung secara spontan dan stabil secara termodinamika, sehingga tokotrienol dapat berikatan dengan protein MMP tanpa memerlukan energi tambahan dari luar sistem.

Semakin rendah (lebih negatif) nilai binding energy, maka semakin kuat dan stabil interaksi antara ligan dan reseptor protein. Dalam studi molecular docking, nilai binding energy di bawah −5 kkal/mol umumnya menunjukkan adanya interaksi yang baik, sedangkan nilai mendekati atau lebih rendah dari −10 kkal/mol mengindikasikan afinitas pengikatan yang sangat kuat. Oleh karena itu, hasil ini menunjukkan bahwa tokotrienol berpotensi memiliki aktivitas inhibisi yang tinggi terhadap MMP yang berperan dalam perkembangan aterosklerosis.

Analisis binding energy juga menggambarkan kestabilan kompleks ligan–protein yang terbentuk melalui interaksi hidrogen, hidrofobik, maupun gaya van der Waals pada sisi aktif protein MMP. Stabilitas interaksi tersebut berkontribusi terhadap kemampuan tokotrienol dalam menghambat aktivitas MMP, sehingga berpotensi mencegah degradasi matriks ekstraseluler yang menjadi salah satu mekanisme penting dalam progresivitas aterosklerosis.

Tabel 4.3 Prediksi ikatan afinitas tokotrienol terhadap beberapa jenis struktur MMP yang berpotensi terlibat dalam proses aterosklerosis

No	Nama protein MMP	Prediksi Ikatan Afinitas (kkal/mol)	Ligan alami
1	MMP-1	-9,86	193022-38-7
2	MMP-2	-9,66	TP0597850
3	MMP-3	-10,52	SCHEMBL4327772
4	MMP-7	-6,03	Marimastat
5	MMP-8	-9,86	ML115
6	MMP-9	-12,88	EN73
7	MMP-10	-5,58	Imidazole
8	MMP-12	-11,96	HS4
9	MMP-13	-10,25	WMM

Keterangan:

MMP = *Matrix Metalloproteinase*, yaitu kelompok enzim protease yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler.

kcal/mol = Kilokalori per mol, satuan energi yang digunakan untuk menunjukkan kekuatan ikatan antara ligan dan protein.

Ligan = Molekul yang dapat berikatan dengan protein target pada situs aktif.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari Tabel 1, MMP-9 merupakan target potensial dari tokotrienol dengan menunjukkan prediksi ikatan afinitas tertinggi sebesar -12,88 kkal/mol. Nilai ini memiliki arti bahwa tokotrienol memiliki kecenderungan pengikatan yang sangat kuat terhadap MMP-9, bahkan lebih kuat dibandingkan ligan alaminya sendiri yang memiliki nilai ikatan afinitas -11,12 kkal/mol. Selisih energi ikatan sebesar 1,76 kkal/mol mengindikasikan bahwa tokotrienol berpotensi menjadi *inhibitor* yang lebih efektif dibandingkan ligan alami MMP-9.

Selain MMP-9, tokotrienol juga menunjukkan ikatan afinitas yang cukup tinggi terhadap MMP-12 (-11,96 kkal/mol), MMP-14 (-10,87 kkal/mol), MMP-3 (-10,52 kkal/mol), dan MMP-13 (-10,25 kkal/mol). Hal ini berarti tokotrienol memiliki spektrum penghambatan yang luas terhadap beberapa jenis MMP, bukan hanya spesifik pada satu jenis saja. Sementara itu, MMP-10 menunjukkan ikatan afinitas terendah (-5,58 kkal/mol), yang mengindikasikan bahwa tokotrienol memiliki selektivitas yang berbeda terhadap masing-masing jenis MMP. Perbedaan nilai ikatan afinitas ini

menunjukkan bahwa struktur situs aktif masing-masing MMP memiliki karakteristik yang berbeda dalam menerima tokotrienol sebagai ligan.

Perbandingan antara ikatan afinitas tokotrienol dengan ligan alami menunjukkan pola yang menarik. Pada beberapa struktur MMP seperti MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13, dan MMP-14, tokotrienol menunjukkan ikatan afinitas yang lebih negatif (lebih kuat) dibandingkan ligan alaminya. Hal ini mengindikasikan bahwa tokotrienol memiliki potensi sebagai kandidat *inhibitor* yang lebih baik dibandingkan ligan alami pada target-target tersebut. Sebaliknya, pada MMP-1 dan MMP-7, ligan alami memiliki ikatan afinitas yang sedikit lebih kuat, yang berarti untuk kedua target ini, ligan alami masih lebih optimal dalam pengikatan.

4.1.5. Analisis Interaksi Molekuler Tokotrienol dengan MMP-9

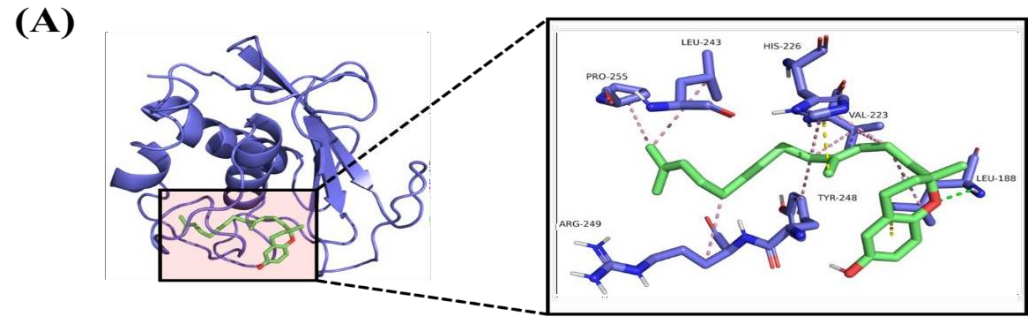
Hasil visualisasi dari kompleks tokotrienol dengan MMP-9 menunjukkan bahwa struktur tokotrienol dapat berikatan dengan asam amino kunci seperti LEU-188, HIS-226, dan TYR-248 (Gambar 2A). Visualisasi interaksi molekuler ini memperlihatkan adanya berbagai jenis ikatan yang terbentuk antara tokotrienol dan residu asam amino pada situs aktif MMP-9. Pola ikatan yang terbentuk meliputi ikatan hidrofobik yang ditunjukkan dengan garis putus-putus hitam, ikatan hidrogen dengan garis putus-putus hijau, ikatan *pi-donor* hidrogen dengan garis putus-putus biru, ikatan *pi-sigma* dengan garis putus-putus kuning, dan ikatan *pi-stacked* yang ditunjukkan dengan garis putus-putus ungu gelap.

Keberagaman jenis ikatan yang terbentuk ini memiliki arti penting dalam stabilitas kompleks tokotrienol-MMP-9. Ikatan hidrogen berperan dalam memberikan spesifisitas pengikatan karena bersifat *directional* (memiliki arah tertentu), sementara ikatan hidrofobik berkontribusi terhadap kekuatan ikatan secara keseluruhan. Ikatan *pi-donor* hidrogen, *pi-sigma*, dan *pi-stacked* melibatkan interaksi dengan sistem aromatik pada asam amino, yang menambah kestabilan kompleks. Kombinasi berbagai jenis ikatan ini menjelaskan mengapa nilai ikatan afinitas tokotrienol terhadap MMP-9 sangat tinggi (-12,88 kkal/mol).

Sebagai pembanding, ligan alami dari struktur MMP-9 (PDB ID: 4XCT) juga menunjukkan kemampuan berikatan dengan asam amino pada situs aktif yang serupa, yaitu LEU-118, HIS-226, TYR-248, dan ALA-189 (Gambar 4.2B). Kemiripan pola ikatan antara tokotrienol dan ligan alami, khususnya pada residu HIS-226 dan TYR-248, mengindikasikan bahwa kedua asam amino ini merupakan

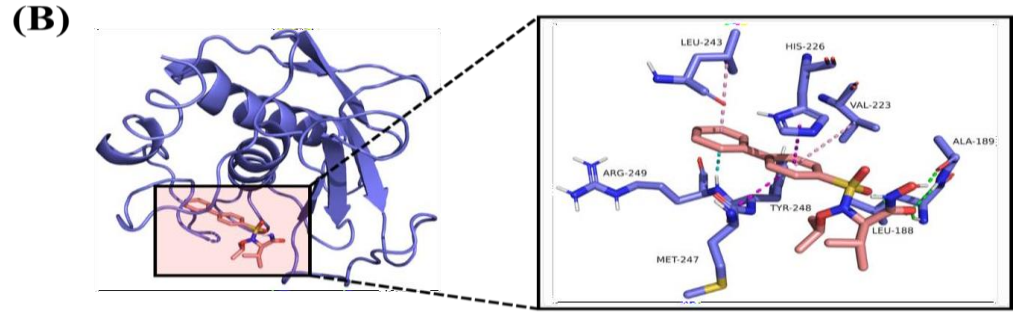
residu kunci (*key residues*) dalam situs aktif MMP-9. Hal ini berarti tokotrienol dapat menempati situs pengikatan yang sama dengan ligan alami MMP-9, sehingga berpotensi berkompetisi dengan substrat alami dan menghambat aktivitas katalitik protein MMP-9.

Kemampuan tokotrienol berikatan dengan residu-residu kunci pada situs aktif MMP-9 memiliki implikasi penting terhadap mekanisme penghambatan. Dengan menduduki situs aktif, tokotrienol dapat menghalangi substrat alami MMP-9 untuk berikatan, sehingga aktivitas proteolitik MMP-9 terhambat. Penghambatan ini bersifat kompetitif, dimana tokotrienol berkompetisi dengan substrat untuk berikatan pada situs yang sama. Pola ikatan yang stabil dan kuat, sebagaimana ditunjukkan oleh nilai ikatan afinitas yang sangat negatif, mengindikasikan bahwa tokotrienol dapat bertahan lama dalam situs aktif dan memberikan efek penghambatan yang efektif.



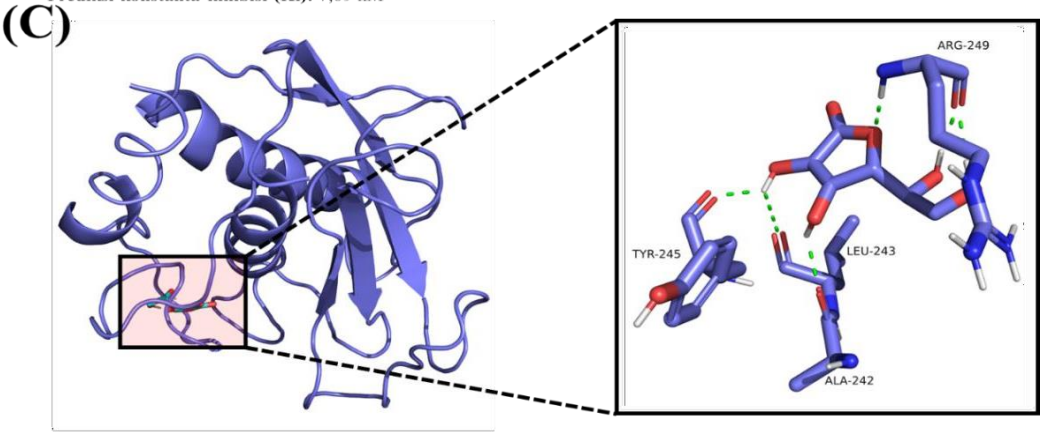
Interaksi Antara Tokotrienol dengan MMP-9

Prediksi afinitas ikatan (ΔG): -12,88 kkal/mol
Prediksi konstanta inhibisi (Ki): 363 pM



Interaksi Antara Ligan alami MMP-9 (EN73) dengan MMP-9

Prediksi afinitas ikatan (ΔG): -11,12 kkal/mol
Prediksi konstanta inhibisi (Ki): 7,09 nM



Interaksi Antara Vitamin C dengan MMP-9

Prediksi afinitas ikatan (ΔG): -6,38 kkal/mol
Prediksi konstanta inhibisi (Ki): 20,98 µM

Gambar 4.2. Visualisasi docking antara tokotrienol dengan MMP-9 **(A)**, ligan alami struktur protein MMP-9 (EN73) dengan MMP-9 **(B)**, dan vitamin c dengan struktur MMP-9 **(C).** Garis putus-putus berwarna hitam adalah ikatan hidrofobik; garis putus-putus berwarna hijau adalah ikatan hidrogen; garis putus-putus berwarna biru adalah ikatan pi-donor hidrogen; garis putus-putus berwarna kuning adalah ikatan pi-sigma; dan garis putus-putus berwarna ungu gelap adalah ikatan pi-stacked

4.1.6. Prediksi Mekanisme Anti-Aterosklerosis Tokotrienol

Berdasarkan hasil analisis interaksi molekuler dan prediksi ikatan afinitas, penelitian ini berhasil memprediksikan kemungkinan mekanisme yang terjadi pada kegagalan proses patogenesis dari aterosklerosis. Mekanisme yang diprediksi berkaitan dengan kemungkinan penurunan aktivitas dari molekul adhesi dan akumulasi dari makrofag seperti ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) dan VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) (Gambar 3).

Prediksi mekanisme ini menunjukkan bahwa ikatan kuat tokotrienol dengan MMP-9 (ΔG = -12,88 kkal/mol) dapat menyebabkan penurunan aktivitas proteolitik MMP-9. Penurunan aktivitas MMP-9 ini memiliki arti bahwa degradasi matriks ekstraselular akan berkurang, yang selanjutnya dapat menghambat migrasi dan infiltrasi sel-sel inflamasi, khususnya makrofag, ke dalam dinding pembuluh darah. Hal ini penting karena akumulasi makrofag dalam intima pembuluh darah merupakan salah satu langkah kunci dalam pembentukan plak aterosklerotik.

Penghambatan MMP-9 oleh tokotrienol juga diprediksi dapat menurunkan ekspresi molekul adhesi seperti ICAM-1 dan VCAM-1. Penurunan ekspresi molekul adhesi ini berarti pelekatan (*adhesion*) makrofag pada sel endotel pembuluh darah akan berkurang. Dengan berkurangnya pelekatan makrofag, maka migrasi transendotel dan akumulasi makrofag di bawah lapisan endotel juga akan menurun. *Cascade* peristiwa ini pada akhirnya menurunkan kemungkinan terjadinya pembentukan plak aterosklerotik dan perkembangan aterosklerosis.

Secara keseluruhan, hasil prediksi ini mengindikasikan bahwa tokotrienol memiliki potensi sebagai agen anti-aterosklerotik melalui jalur penghambatan MMP-9. Mekanisme yang diprediksi menunjukkan bahwa tokotrienol dapat bekerja pada tahap awal proses aterosklerosis, yaitu dengan mencegah rekrutmen dan akumulasi makrofag yang merupakan sel kunci dalam pembentukan *foam cells* dan plak aterosklerotik. Hal ini memberikan landasan teoritis bahwa tokotrienol dapat dikembangkan sebagai kandidat terapi preventif untuk penyakit kardiovaskular yang

berkaitan dengan aterosklerosis.

4.2. Pembahasan

Tokotrienol diprediksi memiliki interaksi yang kuat dengan protein target Matrix Metalloproteinase‑9 dengan nilai energi ikatan sebesar −12,88 kcal/mol. Nilai ini menunjukkan bahwa tokotrienol memiliki afinitas ikatan yang tinggi terhadap MMP-9 sehingga berpotensi menghambat aktivitas enzim tersebut. Penghambatan MMP-9 dapat memengaruhi jalur pensinyalan sel yang melibatkan protein ERK1, ERK2, dan p38, yang merupakan bagian dari jalur MAPK signaling pathway. Aktivasi jalur ini diketahui berperan dalam mengatur faktor transkripsi NF‑κB, yang berfungsi mengendalikan ekspresi berbagai gen pro-inflamasi.

Ketika aktivitas NF-κB menurun, ekspresi molekul adhesi seperti ICAM‑1 dan VCAM‑1 juga akan berkurang. Penurunan ekspresi molekul adhesi ini menyebabkan berkurangnya proses adhesi dan migrasi makrofag ke lapisan endotel pembuluh darah. Akibatnya, akumulasi makrofag dan pembentukan foam cells yang merupakan tahap awal perkembangan Atherosclerosis dapat ditekan.

Dengan demikian, mekanisme yang diprediksi menunjukkan bahwa tokotrienol berpotensi berperan sebagai agen anti-aterosklerosis melalui penghambatan MMP-9 yang berdampak pada penurunan jalur inflamasi dan adhesi sel pada pembuluh darah.

Ekstraksi CPO dari mesokarp kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol menghasilkan ekstrak kental berwarna kuning kecoklatan. Warna kuning menunjukkan kandungan karotenoid yang tinggi, sedangkan warna kecoklatan berasal dari proses oksidasi parsial komponen lipid. [32,33] Metode maserasi dipilih karena tidak memerlukan pemanasan yang dapat merusak senyawa termolabil seperti tokotrienol. [80, 81]

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan hasil yang tidak konsisten dengan persentase inhibisi negatif pada konsentrasi 150 ppm (-181,71%) dan 450 ppm (-37,70%). Fenomena ini

bukan menunjukkan tidak adanya aktivitas antioksidan, melainkan adanya interferensi pengukuran spektrofotometri akibat kompleksitas matriks CPO. [25,27] Interferensi disebabkan oleh: (1) karotenoid yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 517 nm, (2) pembentukan agregat lipid yang menyebabkan hamburan cahaya, dan (3) komponen polar lain yang berinteraksi dengan pelarut. [8,27] Kontrol positif asam askorbat menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat (65,02-69,90% inhibisi) pada konsentrasi rendah (2-8 ppm), mengkonfirmasi bahwa metode DPPH berfungsi baik [24,26]. Untuk sampel CPO, metode alternatif seperti FRAP atau ABTS yang lebih toleran terhadap sampel berminyak lebih direkomendasikan.

Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan *redocking* ligan alami ke struktur MMP. Dari 8 ligan yang diuji, 7 (87,5%) menunjukkan RMSD < 3 Å, mengindikasikan akurasi metode yang sangat baik [20,59,86]. [20,59,86] Nilai RMSD
< 2 Å dianggap sangat baik dan RMSD 2-3 Å masih dapat diterima [20,86]. Keberhasilan validasi ini memberikan keyakinan bahwa prediksi ikatan tokotrienol terhadap MMP dapat diandalkan.

Hasil prediksi menunjukkan tokotrienol dapat berikatan dengan berbagai jenis MMP dengan energi ikatan (ΔG) berkisar -5,58 hingga -12,88 kkal/mol. MMP-9 menunjukkan ikatan afinitas tertinggi (ΔG = -12,88 kkal/mol), bahkan lebih kuat dibandingkan ligan alaminya (ΔG = -11,12 kkal/mol) dengan selisih 1,76 kkal/mol. [77] MMP-9 merupakan target penting karena perannya dalam destabilisasi plak aterosklerotik dan diekspresikan berlebihan pada plak yang tidak stabil. [53,54,55]
Tokotrienol juga menunjukkan ikatan kuat terhadap MMP-12 (-11,96 kkal/mol), MMP-14 (-10,87 kkal/mol), MMP-3 (-10,52 kkal/mol), dan MMP-13 (-10,25 kkal/mol), mengindikasikan spektrum penghambatan yang luas.

Visualisasi interaksi molekuler menunjukkan tokotrienol berikatan dengan residu kunci LEU-188, HIS-226, dan TYR-248 pada situs aktif MMP-9 melalui berbagai jenis ikatan: ikatan hidrogen (*directional*,

memberikan spesifisitas), ikatan hidrofobik dengan LEU-188 (stabilisasi rantai samping lipofilik), dan ikatan π (π-donor hidrogen, π-sigma, π-stacked) dengan sistem aromatik. [10,35,77] Kombinasi berbagai jenis ikatan ini menjelaskan nilai ikatan afinitas yang sangat tinggi (-12,88 kkal/mol).

Kemiripan pola ikatan antara tokotrienol dan ligan alami, khususnya pada HIS-226 dan TYR-248, mengindikasikan kedua residu ini merupakan residu kunci untuk aktivitas katalitik MMP-9. [51] Tokotrienol dapat menduduki situs yang sama dengan ligan alami, menunjukkan mekanisme penghambatan kompetitif dimana tokotrienol berkompetisi dengan substrat untuk berikatan pada situs aktif. [77] Stabilitas kompleks yang tinggi mengindikasikan waktu tinggal (*residence time*) yang lama dalam situs aktif, penting untuk efektivitas penghambatan. [22]

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang melibatkan disfungsi endotel, infiltrasi lipoprotein teroksidasi, ekspresi molekul adhesi, rekrutmen monosit/makrofag, dan pembentukan *foam cells*. [5,44,47] MMP-9 berperan penting dalam degradasi matriks ekstraselular, migrasi sel inflamasi, dan aktivasi sitokin proinflamasi. [15,17,53] Berdasarkan hasil docking, tokotrienol berpotensi menghambat aterosklerosis melalui jalur: (1) penghambatan aktivitas proteolitik MMP-9 dengan ikatan kuat (ΔG = -12,88 kkal/mol), (2) penurunan degradasi matriks ekstraselular dan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 dan VCAM-1, (3) pengurangan pelekatan dan infiltrasi makrofag, dan (4) penurunan pembentukan *foam cells* dan plak aterosklerotik. [17,19,46]

Mekanisme ini didukung oleh studi *in vivo* yang menunjukkan suplementasi tokotrienol dapat mengurangi pembentukan plak aterosklerotik pada model kelinci, [31] mencegah aterosklerosis melalui modulasi PPARs, [37] dan memberikan resistensi terhadap iskemia pada jantung hiperkolesterolemia. [30,42] Selain penghambatan
MMP-9, tokotrienol memiliki aktivitas antioksidan untuk mencegah peroksidasi LDL, [35,36,50] efek anti-inflamasi, [11] dan penurunan kolesterol melalui penghambatan HMG-CoA reduktase. [38,39,40] Efek pleiotropik ini bekerja sinergis memberikan perlindungan komprehensif terhadap

aterosklerosis.

Tokotrienol memiliki profil keamanan yang baik berdasarkan studi toksikologi dan uji klinis. [71,72,73] Studi farmakokinetik menunjukkan tokotrienol dapat diabsorpsi secara oral dan didistribusikan ke jantung dan pembuluh darah meskipun bioavailabilitasnya lebih rendah dibandingkan tokoferol. [60,61] Metabolisme terjadi melalui oksidasi rantai samping dan konjugasi dengan ekskresi melalui urin.

Penelitian ini memberikan landasan teoritis bahwa tokotrienol dari CPO berpotensi dikembangkan sebagai kandidat terapi preventif penyakit kardiovaskular [1,2,3,4]. [1,3,4] Indonesia sebagai produsen kelapa sawit terbesar memiliki sumber daya melimpah untuk ekstraksi tokotrienol. [32,33] Keunggulan tokotrienol terletak pada profil keamanan yang baik, ketersediaan dari sumber alami, dan efek pleiotropik. [8,9,14]

Keterbatasan penelitian meliputi: (1) metode DPPH tidak valid untuk CPO, perlu metode alternatif seperti FRAP/ABTS, (2) hasil docking bersifat prediktif dan perlu validasi eksperimental *in vitro* (assay penghambatan enzim) dan *in vivo* (model hewan), (3) belum membedakan aktivitas berbagai isomer tokotrienol (α-, β-, γ-, δ-), (4) mekanisme perlu diverifikasi dengan mengukur langsung ekspresi MMP-9, ICAM-1, VCAM-1, dan infiltrasi makrofag, dan (5) aspek farmakokinetik belum dipertimbangkan dalam prediksi dosis terapeutik. [10,26,60]

Pengembangan selanjutnya memerlukan: (1) validasi *in vitro* untuk mengkonfirmasi penghambatan MMP-9, (2) studi *in vivo* pada model hewan aterosklerosis, (3) optimalisasi formulasi untuk meningkatkan bioavailabilitas, (4) uji klinis untuk evaluasi keamanan dan efikasi, dan (5) penelitian tentang tokotrienol-rich fraction (TRF) untuk efek sinergis antar isomer. Pendekatan *in silico* dapat mempercepat penemuan senyawa bioaktif dari sumber daya alam Indonesia. Hasil penelitian ini membuka peluang pengembangan tokotrienol sebagai nutraceutical atau agen terapi yang berkontribusi terhadap kesehatan
masyarakat dan memberikan nilai tambah ekonomi pada industri kelapa sawit Indonesia. [20,64,78]

Pada penelitian ini, digunakan 10 jenis struktur protein matriks metalloproteinase (MMP) yang dimana terdapat ligan alami. Validasi docking menunjukkan bahwa dari 8 ligan alami yang didocking ulang, 7 diantaranya dapat bersuperimposisi dengan posisi awalnya dengan kurang dari 3 angstrom perbedaan jaraknya (RMSD) (Gambar 1). Tabel 1 menunjukkan bahwa tokotrienol adalah sebuah senyawa yang menjanjikan sebagai penghambat protein MMP dengan prediksi ikatan afinitas mulai dari -5,58 kkal/mol hingga -12,88 kkal/mol. Didapatkan bahwa MMP-9 merupakan target potensial dari tokotrienol dengan menunjukkan prediksi afinitas ikatan sebesar -12,88 kkal/mol. Berdasarkan hasil visualisasi dari kompleks tokotrienol dengan MMP-9 diprediksi bahwa struktur tokotrienol dapat berikatan dengan asam amino kunci seperti LEU-188, HIS-226 dan TYR-248 (Gambar 2A).

Hal ini juga terlihat pada ligan alami dari struktur MMP-9 (PDB ID: 4XCT) yang dapat berikatan dengan asam amino yang juga dapat berikatan dengan LEU-118, HIS-226, TYR-248, dan ALA-189 yang merupakan situs aktif dari protein MMP-9 (Gambar 2B). Selain tokotrienol dan ligan alami, penelitian ini juga memprediksi ikatan antara vitamin C dengan struktur MMP-9. Akan tetapi, afinitas ikatan yang diberikan oleh vitamin C terhadap MMP-9 lebih rendah dibandingkan dengan tokotrienol dan EN73, yaitu -6,38 kkal/mol. Terbentuknya ikatan hidrogen oleh vitamin c terhadap struktur MMP-9 melibatkan berbagai asam amino seperti ALA-242, LEU-243, TYR-245, dan ARG-249. Dalam penelitian ini juga dapat memprediksikan kemungkinan mekanisme yang terjadi pada kegagalan proses patogenesis dari aterosklerosis yang berkaitan dengan kemungkinan penurunan aktivitas dari molekul adhesi dan akumulasi dari makrofag seperti ICAM-1 dan VCAM-1.

Ekstraksi CPO dari mesokarp kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol menghasilkan ekstrak kental berwarna kuning kecoklatan. Warna kuning menunjukkan adanya kandungan karotenoid yang cukup tinggi, sedangkan warna kecoklatan diduga berasal dari proses oksidasi parsial komponen lipid.

Metode maserasi dipilih karena tidak memerlukan proses pemanasan sehingga dapat mempertahankan stabilitas senyawa bioaktif yang bersifat termolabil, seperti tokotrienol. Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, diperoleh nilai IC_{50} sebesar 672,25 ppm. Nilai tersebut menunjukkan bahwa CPO memerlukan konsentrasi yang relatif tinggi untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Selain itu, pada konsentrasi 150 ppm dan 450 ppm diperoleh nilai persentase inhibisi negatif, yaitu masing-masing sebesar -181,71% dan -37,70%. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa nilai absorbansi sampel lebih tinggi dibandingkan absorbansi kontrol. Kondisi ini diduga terjadi akibat interferensi pengukuran spektrofotometri yang disebabkan oleh kompleksitas matriks CPO, seperti kandungan karotenoid yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 517 nm, pembentukan agregat lipid yang menyebabkan hamburan cahaya, serta keberadaan komponen lain yang memengaruhi pembacaan absorbansi. Oleh karena itu, meskipun metode DPPH menghasilkan nilai IC_{50} yang tergolong tinggi, hasil tersebut belum tentu sepenuhnya mencerminkan kapasitas antioksidan CPO karena adanya kemungkinan gangguan selama proses pengukuran.

Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa tokotrienol, sebagai salah satu komponen bioaktif utama dalam CPO, memiliki afinitas ikatan yang tinggi terhadap berbagai protein Matrix Metalloproteinase (MMP). Validasi metode dilakukan melalui proses *redocking*, yang menunjukkan bahwa 7 dari 8 ligan alami memiliki nilai RMSD < 3 A, sehingga metode yang digunakan dinilai memiliki akurasi yang baik dalam memprediksi interaksi ligan-protein. Di antara seluruh target yang diuji, MMP-9 menunjukkan afinitas ikatan tertinggi dengan nilai energi ikatan (ΔG) sebesar −12,88 kkal/mol, bahkan lebih kuat dibandingkan ligan alaminya (ΔG = −11,12 kkal/mol). Visualisasi interaksi molekuler menunjukkan bahwa tokotrienol berikatan dengan residu penting pada situs aktif MMP-9, yaitu LEU-188, HIS-226, dan TYR-248, melalui ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi π. Kemiripan pola interaksi antara tokotrienol dan ligan alami mengindikasikan bahwa tokotrienol berpotensi menghambat

MMP-9 melalui mekanisme kompetitif dengan menempati situs aktif enzim tersebut.

Secara biologis, penghambatan MMP-9 diperkirakan dapat memengaruhi jalur pensinyalan MAPK yang melibatkan protein ERK1, ERK2, dan p38 sehingga menghambat aktivasi faktor transkripsi NF-κB. Penurunan aktivitas NF-κB selanjutnya diperkirakan menurunkan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 dan VCAM-1, sehingga proses adhesi dan migrasi makrofag menuju endotel pembuluh darah dapat ditekan. Dampak lanjutannya adalah berkurangnya pembentukan *foam cells* yang merupakan salah satu tahapan awal perkembangan aterosklerosis. Dengan demikian, meskipun hasil uji DPPH menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 672,25 ppm yang mengindikasikan aktivitas penangkap radikal bebas relatif rendah pada kondisi pengujian, hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa tokotrienol tetap memiliki potensi biologis sebagai agen antiaterosklerosis melalui mekanisme penghambatan MMP-9. Perbedaan hasil tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan berdasarkan metode DPPH dan aktivitas biologis berdasarkan *molecular docking* merupakan dua pendekatan yang berbeda, sehingga keduanya saling melengkapi dalam menjelaskan potensi farmakologis CPO.

Keterbatasan penelitian ini terletak pada pendekatan yang digunakan, yaitu kombinasi analisis *in silico* (molecular docking) dan uji aktivitas antioksidan yang masih bersifat pendahuluan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel memiliki nilai IC_{50} sebesar 672,25 ppm, yang mengindikasikan aktivitas antioksidan dalam kategori lemah. Selain itu, hasil *molecular docking* hanya memberikan prediksi mengenai afinitas ikatan dan potensi interaksi senyawa aktif dengan target protein berdasarkan simulasi komputasi, sehingga belum dapat sepenuhnya menggambarkan respons biologis yang terjadi pada sistem hidup. Oleh karena itu, hasil penelitian ini perlu dikonfirmasi melalui penelitian lanjutan menggunakan metode in vitro untuk mengevaluasi aktivitas biologis secara eksperimental, serta in vivo untuk mengkaji efektivitas, mekanisme kerja, farmakokinetik, keamanan, dan toksisitas senyawa dalam organisme. Dengan demikian,

penelitian ini merupakan tahap awal (preliminary study) yang memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan penelitian berikutnya dalam mengevaluasi potensi tokotrienol dari minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) sebagai kandidat agen antiaterosklerosis.

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai potensi tokotrienol dari CPO (Crude Palm Oil) sebagai kandidat agen anti-aterosklerosis melalui pendekatan *in silico* dan uji aktivitas antioksidan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji aktivitas antioksidan tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) menggunakan metode DPPH menunjukkan nilai persentase inhibisi yang bervariasi pada setiap konsentrasi. Nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 672,25 ppm, sehingga aktivitas antioksidan tokotrienol minyak sawit berdasarkan metode DPPH tergolong sangat lemah.
2. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol memiliki afinitas terhadap enzim MMP-2 yang ditunjukkan oleh nilai *binding energy*, konstanta inhibisi (Ki), serta interaksi dengan residu asam amino pada sisi aktif enzim. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol berpotensi berinteraksi dengan MMP-2 sebagai target jalur degradasi matriks ekstraseluler.
3. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol memiliki afinitas terhadap enzim MMP-9. Tokotrienol menunjukkan energi pengikatan (*binding energy*) yang kuat, khususnya pada MMP-9 dengan nilai ΔG sebesar −12,88 kkal/mol, disertai nilai konstanta inhibisi (Ki) yang rendah serta interaksi dengan residu asam amino pada sisi aktif enzim. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol berpotensi menghambat aktivitas MMP-9 sehingga berpotensi dikembangkan sebagai senyawa yang berperan dalam menghambat jalur degradasi matriks ekstraseluler pada aterosklerosis.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan uji in vitro dan in vivo

guna mengkonfirmasi aktivitas biologis tokotrienol yang telah diprediksi melalui pendekatan in silico.

2. Penelitian selanjutnya dapat mengkaji interaksi tokotrienol terhadap protein target lain yang berperan dalam perkembangan aterosklerosis sehingga dapat memberikan gambaran mekanisme kerja yang lebih komprehensif.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait pengembangan formulasi tokotrienol dari minyak sawit sebagai kandidat senyawa terapeutik atau preventif terhadap penyakit kardiovaskular.

DAFTAR PUSTAKA

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: Update from the GBD 2019 Study. J Am Coll Cardiol. 2020;76(25):2982–3021. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010.
2. Muharram FR, Multazam CECZ, Mustofa A, Sari DP, Hidayat R, Pranata R, et al. The 30 years of shifting in the Indonesian cardiovascular burden: Analysis of the Global Burden of Disease Study. J Epidemiol Glob Health. 2024;14(1):193–212. doi:10.1007/s44197-024-00187-8.
3. Adisasmito W, Amir V, Atin A, Megraini A, Kusuma D. Geographic and socioeconomic disparity in cardiovascular risk factors in Indonesia: Analysis of the Basic Health Research 2018. BMC Public Health. 2020;20(1):1–13. doi:10.1186/s12889-020-09099-1.
4. Maharani A, Sujarwoto, Praveen D, Oceandy D, Tampubolon G, Patel A. Cardiovascular disease risk factor prevalence and estimated 10-year cardiovascular risk scores in Indonesia: The SMARThealth Extend Study. PLoS One. 2019;14(4). doi:10.1371/journal.pone.0215219.
5. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1):56. doi:10.1038/s41572-019-0106-z.
6. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011;145(3):341–355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005.
7. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. Circ Res. 2014;114(12):1852–1866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
8. Loganathan R, Subramaniam KM, Radhakrishnan AK, Choo YM, Teng KT. Health-promoting effects of red palm oil: Evidence from animal and human studies. Nutr Rev. 2017;75(2):98–113. doi:10.1093/nutrit/nuw054.
9. Voon PT, Ng TKW, Lee VKM, Nesaretnam K. Diets high in palmitic acid (16:0), lauric and myristic acids (12:0 + 14:0), or oleic acid (18:1) do not alter postprandial or fasting plasma homocysteine and inflammatory markers in healthy Malaysian adults. Am J Clin Nutr. 2011;94(6):1451–

1457. doi:10.3945/ajcn.111.020107.

10. Ahsan H, Ahad A, Siddiqui WA. A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. J Chem Biol. 2015;8(2):45–59. doi:10.1007/s12154-014-0127-8.
11. Aggarwal V, Kashyap D, Sak K, Tuli HS, Jain A, Chaudhary A, et al. Molecular mechanisms of action of tocotrienols in cancer: Recent trends and advancements. Int J Mol Sci. 2019;20(3):656. doi:10.3390/ijms20030656.
12. Qureshi AA, Khan DA, Mahjabeen W, Papasian CJ, Qureshi N. Suppression of nitric oxide production and cardiovascular risk factors in healthy seniors and hypercholesterolemic subjects by a combination of polyphenols and vitamins. J Clin Exp Cardiol. 2012;Suppl 5. doi:10.4172/2155-9880.S5-008
13. Zuo Y, Peng C, Liang Y, Ma KY, Chan HY, Huang Y, et al. Sesamin extends the mean lifespan of fruit flies. Biogerontology. 2013;14(2):107–119. doi:10.1007/s10522-012-9413-4.
14. Meganathan P, Fu JY. Biological properties of tocotrienols: Evidence in human studies. Int J Mol Sci. 2016;17(10):1682. doi:10.3390/ijms17101682.
15. Newby AC. Metalloproteinase production from macrophages: A perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. Exp Physiol. 2016;101(11):1327–1337. doi:10.1113/EP085567.
16. Johnson JL, Dwivedi A, Somerville M, George SJ, Newby AC. Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) activates MMP-9-mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(9)–e44. doi:10.1161/ATVBAHA.111.225623.
17. Metalloproteinases M, David Kass M, Rabinovitch M, Galis ZS, Khatri JJ. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis. *Circ Res*. 2002;90(3):251-262. doi:10.1161/RES.90.3.251
18. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(2):346-359. doi:10.1016/J.BCP.2007.07.004
19. Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix Metalloproteinases

as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol 21, Page 3946*. 2020;21(11):3946. doi:10.3390/IJMS21113946

20. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol 20, Page 4331*. 2019;20(18):4331. doi:10.3390/IJMS20184331
21. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev*. 2017;9(2):91-102. doi:10.1007/S12551-016-0247-1/METRICS
22. Fischer T, Riedl R. Challenges with matrix metalloproteinase inhibition and future drug discovery avenues. *Expert Opin Drug Discov*. 2021;16(1):75-88. doi:10.1080/17460441.2020.1819235
23. Wang Z, Sun H, Yao X, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2016;18(18):12964-12975. doi:10.1039/C6CP01555G
24. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/S13197-011-0251-1/METRICS
25. Xie J, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2014;62(19):4251-4260. doi:10.1021/JF500180U
26. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem*. 2005;53(10):4290-4302. doi:10.1021/JF0502698
27. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013;763:1-10. doi:10.1016/J.ACA.2012.11.051
28. Wong SK, Chin KY, Ima-Nirwana S. The Effects of Tocotrienol on Bone Peptides in a Rat Model of Osteoporosis Induced by Metabolic Syndrome: The Possible Communication between Bone Cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(18):3313. doi:10.3390/IJERPH16183313

29. M. Castro M, E. Tanus-Santos J. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Curr Drug Targets*. 2013;14(3):335-343. doi:10.2174/1389450111314030005
30. Das S, Mukherjee S, Lekli I, et al. Tocotrienols confer resistance to ischemia in hypercholesterolemic hearts: insight with genomics. *Mol Cell Biochem*. 2012;360(1-2):35-45. doi:10.1007/S11010-011-1041-9
31. Abdul Rahman T, Hassim NF, Zulkafli N, Muid S, Kornain NK, Nawawi H. Atheroprotective effects of pure tocotrienol supplementation in the treatment of rabbits with experimentally induced early and established atherosclerosis. *Food Nutr Res*. 2016;60(1):10.3402/fnr.v60.31525. doi:10.3402/FNR.V60.31525
32. Nair KP. Oil Palm (Elaeis guineensis Jacquin). *Tree Crops*. Published online 2021:249-285. doi:10.1007/978-3-030-62140-7_7
33. Sahner J, Budi SW, Barus H, et al. Degradation of root community traits as indicator for transformation of tropical lowland rain forests into oil palm and rubber plantations. *PLoS One*. 2015;10(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0138077
34. Zaki NM, Schwarzacher T, Singh R, et al. Chromosome identification in oil palm (Elaeis guineensis) using in situ hybridization with massive pools of single copy oligonucleotides and transferability across Arecaceae species. *Chromosome Res*. 2021;29(3-4):373-390. doi:10.1007/S10577-021-09675-0
35. Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of α-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition*. 2001;131(2). doi:10.1093/jn/131.2.369s
36. Nesaretnam K, Ambra R, Selvaduray KR, Radhakrishnan A, Canali R, Virgili F. Tocotrienol-rich fraction from palm oil and gene expression in human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1031:143-157. doi:10.1196/ANNALS.1331.014
37. Li F, Tan W, Kang Z, Wong CW. Tocotrienol enriched palm oil prevents atherosclerosis through modulating the activities of peroxisome proliferators-activated receptors.,*Atherosclerosis*. 2010;211(1):278-282.

doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.015

38. Qureshi AA, Khan DA, Silswal N, Saleem S, Qureshi N. Evaluation of Pharmacokinetics, and Bioavailability of Higher Doses of Tocotrienols in Healthy Fed Humans. *J Clin Exp Cardiolog*. 2016;7(4):434. doi:10.4172/2155-9880.1000434
39. Qureshi AA, Bradlow BA, Brace L, et al. Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids*. 1995;30(12):1171-1177. doi:10.1007/BF02536620
40. Qureshi AA, Qureshi N, Wright JJK, et al. Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *Am J Clin Nutr*. 1991;53(4 Suppl). doi:10.1093/AJCN/53.4.1021S
41. Wong WY, Ward LC, Fong CW, Yap WN, Brown L. Anti-inflammatory γ- and δ-tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. *Eur J Nutr*. 2017;56(1):133-150. doi:10.1007/S00394-015-1064-1
42. Das S, Mukherjee S, Lekli I, et al. Tocotrienols confer resistance to ischemia in hypercholesterolemic hearts: insight with genomics. *Mol Cell Biochem*. 2012;360(1-2):35-45. doi:10.1007/S11010-011-1041-9
43. Abdul Rahman T, Hassim NF, Zulkafli N, Muid S, Kornain NK, Nawawi H. Atheroprotective effects of pure tocotrienol supplementation in the treatment of rabbits with experimentally induced early and established atherosclerosis. *Food Nutr Res*. 2016;60(1). doi:10.3402/FNR.V60.31525
44. Ajoolabady A, Pratico D, Lin L, et al. Inflammation in atherosclerosis: pathophysiology and mechanisms. *Cell Death Dis*. 2024;15(11). doi:10.1038/S41419-024-07166-8
45. Yurtseven E, Ural D, Baysal K, Tokgözoğlu L. An Update on the Role of PCSK9 in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2020;27(9):909. doi:10.5551/JAT.55400
46. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
47. Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis*

Primers. 2019;5(1):1-18. doi:10.1038/S41572-019-0106-Z;SUBJMETA

48. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-533. doi:10.1038/S41586-021-03392-8
49. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-632. doi:10.1111/JOIM.12296
50. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*.2003;108(16):1912-1916. doi:10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB
51. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.*Cardiovasc Res*. 2006;69(3):562-573. doi:10.1016/J.CARDIORES.2005.12.002
52. Samah N, Ugusman A, Hamid AA, Sulaiman N, Aminuddin A. Role of Matrix Metalloproteinase-2 in the Development of Atherosclerosis among Patients with Coronary Artery Disease. *Mediators Inflamm*. 2023;2023:9715114. doi:10.1155/2023/9715114
53. Sluijter JPG, Pulskens WPC, Schoneveld AH, Velema E, Strijder CFM, Moll F, et al. Matrix metalloproteinase-2 is associated with stable and matrix metalloproteinases-8 and -9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: A study in human endarterectomy specimens pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. Stroke. 2006;37(1):235–239. doi:10.1161/01.STR.0000196986.50059.E0.
54. Li T, Li X, Feng Y, Dong G, Wang Y, Yang J. The role of matrix metalloproteinase-9 in atherosclerotic plaque instability. Mediators Inflamm. 2020;2020:3872367. doi:10.1155/2020/3872367.
55. Newby AC. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. Matrix Biol. 2015;44–46:157–166. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.015.
56. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases-3, -7, -9, and -12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. Proc Natl Acad Sci U S A.

2005;102(43):15575–15580. doi:10.1073/pnas.0506201102.

57. Chigurupati S, Al-Murikhy A, Almahmoud SA, Alhamdan MS, Alhamdan RS, Khan AA, et al. Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract from the Qassim region, Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci. 2022;29(2):854–859. doi:10.1016/j.sjbs.2021.10.021.
58. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. Methods Mol Biol. 2008;443:365–382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
59. Ramírez D, Caballero J. Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data? Molecules. 2018;23(5):1038. doi:10.3390/molecules23051038.
60. Yap SP, Yuen KH, Wong JW. Pharmacokinetics and bioavailability of α-, γ- and δ-tocotrienols under different food status. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001;53(1):67-71. doi:10.1211/0022357011775208
61. Khanna S, Patel V, Rink C, Roy S, Sen CK. Delivery of orally supplemented α-tocotrienol to vital organs of rats and tocopherol-transport protein deficient mice. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(10):1310-1319. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.013
62. Drotleff AM, Bohnsack C, Schneider I, Hahn A, Ternes W. Human oral bioavailability and pharmacokinetics of tocotrienols from tocotrienol-rich (tocopherol-low) barley oil and palm oil formulations. *J Funct Foods*. 2014;7(1):150-160. doi:10.1016/J.JFF.2014.01.001
63. Sharif M, Khan DA, Farhat K, Noor M, Khan MA, Rafique S. Pharmacokinetics and bioavailability of tocotrienols in healthy human volunteers: a systematic review. *J Pak Med Assoc*. 2023;73(3):603-610. doi:10.47391/JPMA.6008
64. Fu JY, Che HL, Tan DMY, Teng KT. Bioavailability of tocotrienols: Evidence in human studies. *Nutr Metab (Lond)*. 2014;11(1):1-10. doi:10.1186/1743-7075-11-5/TABLES/2
65. Kato Y, Uchiumi H, Usami R, et al. Tocotrienols reach the brain and play roles in the attenuation of body weight gain and improvement of cognitive function in high-fat diet-treated mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2021;69(3):256.

doi:10.3164/JCBN.21-10

66. Birringer M, Pfluger P, Kluth D, Landes N, Brigelius-Flohé R. Identities and Differences in the Metabolism of Tocotrienols and Tocopherols in HepG2 Cells. *J Nutr*. 2002;132(10):3113-3118. doi:10.1093/JN/131.10.3113
67. Parker BA, Pearce BC, Clark RW, Gordon DA, Wright JJK. Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(15):11230-11238. doi:10.1016/S0021-9258(18)82115-9
68. Zhao Y, Lee MJ, Cheung C, et al. Analysis of multiple metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans. *J Agric Food Chem*. 2010;58(8):4844-4852. doi:10.1021/JF904464U
69. Brigelius-Flohé R. Vitamin E and drug metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):737-740. doi:10.1016/S0006-291X(03)00811-8
70. Lodge JK, Ridlington J, Leonard S, Vaule H, Traber MG. α- and γ-Tocotrienols are metabolized to carboxyethyl-hydroxychroman derivatives and excreted in human urine. *Lipids*. 2001;36(1):43-48. doi:10.1007/S11745-001-0666-Z/METRICS
71. Nakamura H, Furukawa F, Nishikawa A, et al. Oral toxicity of a tocotrienol preparation in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39(8):799-805. doi:10.1016/S0278-6915(01)00025-4
72. Aguilar F, Autrup H, Barlow S, et al. Opinion on mixed tocopherols, tocotrienol tocopherol and tocotrienols as sources for vitamin E added as a nutritional substance in food supplements - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with food (AFC). *EFSA Journal*. 2008;6(3):640. doi:10.2903/J.EFSA.2008.640
73. Mahipal A, Klapman J, Vignesh S, et al. Pharmacokinetics and Safety of Vitamin E δ-Tocotrienol after Single and Multiple Doses in Healthy Subjects with Measurement of Vitamin E Metabolites. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(1):157. doi:10.1007/S00280-016-3048-0

74. Pervez MA, Khan DA, Ijaz A, Khan S. Effects of Delta-tocotrienol Supplementation on Liver Enzymes, Inflammation, Oxidative stress and Hepatic Steatosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Turk J Gastroenterol*. 2018;29(2):170-176. doi:10.5152/TJG.2018.17297
75. Shen CL, Mo H, Dunn DM, Watkins BA. Tocotrienol Supplementation Led to Higher Serum Levels of Lysophospholipids but Lower Acylcarnitines in Postmenopausal Women: A Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial. *Front Nutr*. 2021;8. doi:10.3389/FNUT.2021.766711
76. Yamauchi M, Kitamura Y, Nagano H, Kawatsu J, Gotoh H. DPPH Measurements and Structure—Activity Relationship Studies on the Antioxidant Capacity of Phenols. *Antioxidants*. 2024;13(3):309. doi:10.3390/ANTIOX13030309/S1
77. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2011;7(2):146-157. doi:10.2174/157340911795677602
78. Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1388-D1395. doi:10.1093/NAR/GKAA971
79. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455-461. doi:10.1002/JCC.21334
80. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine 2018 13:1*. 2018;13(1):1-26. doi:10.1186/S13020-018-0177-X
81. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*. 2013;117(4):426-436. doi:10.1016/J.JFOODENG.2013.01.014
82. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/S13197-011-0251-1

83. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, et al. RCSB Protein Data Bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. Nucleic Acids Res. 2021;49(D1)–D451. doi:10.1093/nar/gkaa1038.
84. Xue Q, Liu X, Russell P, Li J, Pan W, Fu J, et al. Evaluation of the binding performance of flavonoids to estrogen receptor alpha by AutoDock, AutoDock Vina and Surflex-Dock. Ecotoxicol Environ Saf. 2022;233:113323. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113323.
85. Seeliger D, de Groot BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and AutoDock/Vina. J Comput Aided Mol Des. 2010;24(5):417–422. doi:10.1007/s10822-010-9352-6.
86. Ramírez D, Caballero J. Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data? Molecules. 2018;23(5):1038. doi:10.3390/molecules23051038.
87. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. J Chem Inf Model. 2021;61(8):3891–3898. doi:10.1021/acs.jcim.1c00203.
88. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. Nat Protoc. 2016;11(5):905–919. doi:10.1038/nprot.2016.051.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Ethical Clearance

UMSU

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMITTEE
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FACULTY OF MEDICINE AND HELATH SCIENCES UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
"ETHICAL APPROVAL"
No : 50/KEPK/FKUMSU/2025

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
The Research protocol proposed by

Peneliti Utama / *Principal in investigator* : **Ayunda Novita Sari**

Nama Institusi / *Name of the Instutution* : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara / *Faculty of Medicine and Health Sciences University of Muhammadiyah Sumatera Utara*

Dengan Judul / *Tittle*

"ANALISIS POTENSI ANTIOKSIDAN SENYAWA TOKOTRIENOL DARI MINYAK BUAH KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis Jacq.*) TERHADAP ATEROSKLEROSIS MELALUI JALUR MMP (*Matrix metalloproteinase*) DENGAN METODE MOLECULAR DOCKING DAN UJI DPPH"

"ANALYSIS OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF TOCOTRIENOL COMPOUNDS FROM PALM OIL FRUIT (Elaeis guineensis Jacq.) AGAINST ATHEROSCLEROSIS THROUGH MMP (Matrix Metalloproteinase) PATHWAY USING MOLECULAR DOCKING AND DPPH ASSAY METHODS"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan
7) Persetujuan Setelah Penjelasan,yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016.Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declarated to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards,1)Social Values,2)Scentific Values,3)Equitable Assesment and Benefits,4)Risks,5)Persuasion / Exploitation,6) Confidentiality and Privacy,and 7)Informed Consent,refering to the 2016 CIOMS Guadelines.This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 12 Desember 2025 sampai dengan tanggal 12 Desember 2026
The declaration of ethics applies during the periode December 12 ,2025 until December 12 ; 2026

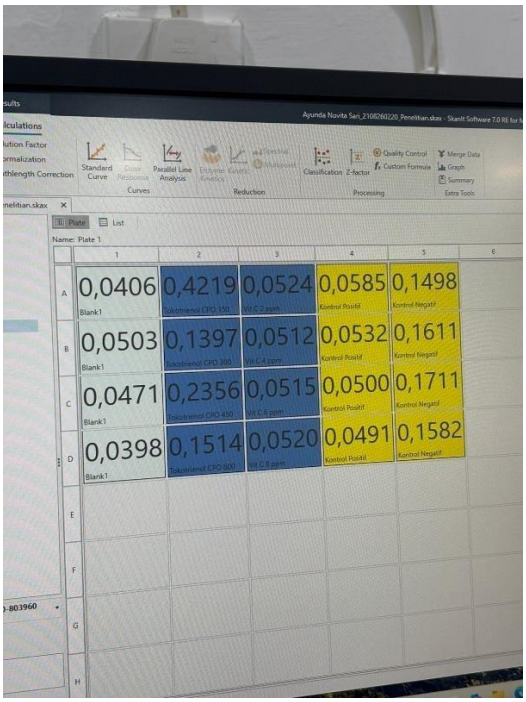
Medan, 12 Desember 2025
Ketua

Assoc.Prof.Dr.dr.Nurfadly,MKT

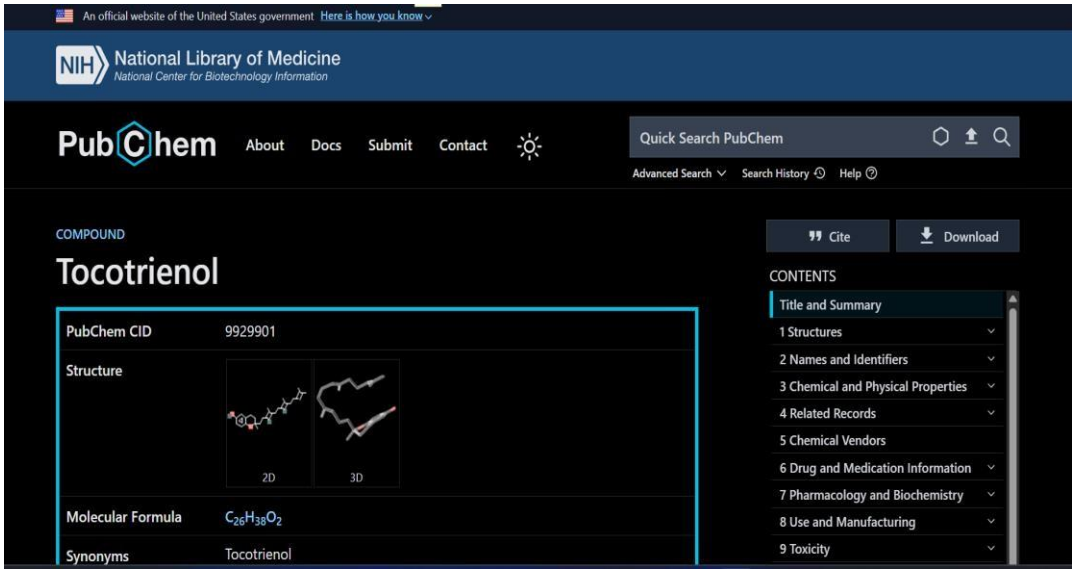
Lampiran 2. Dokumentasi



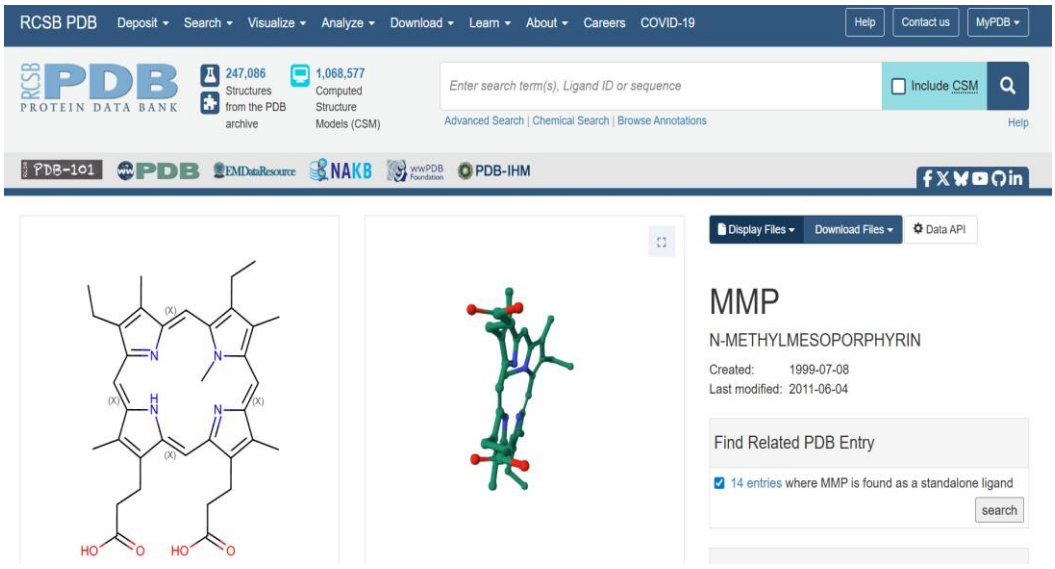
Gambar 1. Tabung reaksi berisi sampel uji yang direaksikan dengan larutan DPPH



Gambar 2. Data absorbansi hasil pembacaan spektrofotometer uji DPPH yang ditampilkan dalam Microsoft Excel



Gambar 3. Informasi senyawa tocotrienol dari database PubChem



Gambar 4. Struktur kimia 2D dan 3D senyawa N-methylmesoporphyrin (MMP) dari database RCSB Protein Data Bank (PDB)

Analisis Potensi Antioksidan Senyawa Tokotrienol dari Minyak Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Terhadap Aterosklerosis Melalui Jalur MMP (*Matrix Metalloproteinase*) dengan Metode *Molecular Docking* dan Uji DPPH (*1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil*)

Ayunda Novita Sari[1] , Yenita[2] , Emmi Purwoningsih[3] , Fani Ade Irma[4]

Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

Abstrak

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis pada pembuluh darah yang menjadi penyebab utama penyakit kardiovaskular di dunia. Progresivitas penyakit ini dipengaruhi oleh stres oksidatif, inflamasi kronis, serta peningkatan aktivitas Matrix Metalloproteinase (MMP), khususnya MMP-2 dan MMP-9 yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler dan instabilitas plak aterosklerotik. Tokotrienol yang merupakan komponen utama vitamin E pada minyak sawit (Elaeis guineensis Jacq.) diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dan berpotensi memodulasi ekspresi MMP.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi tokotrienol minyak sawit sebagai kandidat inhibitor MMP-2 dan MMP-9 melalui pendekatan aktivitas antioksidan menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan analisis molecular docking.

Penelitian menggunakan pendekatan eksperimental dan komputasional. Aktivitas antioksidan tokotrienol dianalisis menggunakan metode DPPH dengan parameter nilai IC_{50}. Analisis molecular docking dilakukan terhadap empat isomer tokotrienol (α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol) menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina untuk memprediksi afinitas ikatan terhadap protein target MMP-2 dan MMP-9 berdasarkan nilai binding energy serta jenis interaksi molekuler yang terbentuk.

Tokotrienol menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat berdasarkan nilai IC_{50} serta memiliki afinitas pengikatan yang baik terhadap MMP-2 dan MMP-9. Interaksi molekuler yang terbentuk didominasi oleh ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik pada residu asam amino di sisi aktif protein, sehingga mengindikasikan potensi penghambatan aktivitas kedua enzim tersebut. Tokotrienol minyak sawit berpotensi dikembangkan sebagai senyawa alami yang memiliki aktivitas antioksidan sekaligus kandidat inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam upaya pencegahan maupun terapi adjuvan aterosklerosis. Penelitian lanjutan secara in vitro, in vivo, dan uji klinis diperlukan untuk mengonfirmasi efektivitas dan keamanan penggunaannya.

Kata Kunci: *aterosklerosis; tokotrienol; minyak sawit; MMP-2; MMP-9; DPPH; molecular docking.*

Pendahuluan

Penyakit kardiovaskular (PKV) hingga saat ini masih menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas di berbagai negara. Organisasi Kesehatan Dunia (*World Health Organization*/WHO) melaporkan bahwa lebih dari 17 juta kematian setiap tahun disebabkan oleh penyakit kardiovaskular, dengan sekitar 85% di antaranya merupakan akibat penyakit jantung koroner dan stroke. Sebagian besar kejadian tersebut berawal dari proses aterosklerosis yang berkembang secara perlahan selama bertahun-tahun sebelum menimbulkan manifestasi klinis akut. Peningkatan prevalensi hipertensi, diabetes melitus, dislipidemia, obesitas, serta kebiasaan merokok menyebabkan angka kejadian aterosklerosis terus meningkat, terutama di negara berkembang, termasuk Indonesia. Kondisi tersebut menjadikan aterosklerosis sebagai salah satu masalah kesehatan yang memerlukan upaya pencegahan dan penanganan yang lebih efektif.

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang ditandai oleh penumpukan lipid, infiltrasi sel inflamasi, proliferasi sel otot polos vaskular (*vascular smooth muscle cells*), dan pembentukan plak pada lapisan intima arteri. Proses ini diawali oleh disfungsi endotel akibat berbagai faktor risiko seperti hiperkolesterolemia, hipertensi, diabetes melitus, merokok, maupun stres oksidatif. Kerusakan endotel meningkatkan permeabilitas dinding pembuluh darah sehingga lipoprotein densitas rendah (*low-density lipoprotein*/LDL) dapat memasuki tunika intima dan mengalami oksidasi menjadi *oxidized LDL* (ox-LDL). LDL teroksidasi kemudian memicu rekrutmen monosit dan diferensiasinya menjadi makrofag yang menelan ox-LDL hingga membentuk *foam cell*. Akumulasi *foam cell* membentuk *fatty streak* yang selanjutnya berkembang menjadi plak aterosklerotik. Perkembangan plak yang disertai inflamasi kronis akan meningkatkan risiko ruptur plak dan pembentukan trombus yang menjadi penyebab utama infark miokard maupun stroke.

Selain akumulasi lipid, stres oksidatif merupakan faktor penting dalam patogenesis aterosklerosis. Produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan menyebabkan oksidasi LDL, menurunkan bioavailabilitas *nitric oxide*, serta mengaktifkan berbagai jalur pensinyalan proinflamasi seperti *Nuclear Factor-kappa B* (NF-κB). Aktivasi jalur tersebut meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi, molekul adhesi, serta berbagai enzim proteolitik yang mempercepat perkembangan plak aterosklerotik. Interaksi antara stres oksidatif dan inflamasi membentuk suatu lingkaran patofisiologi yang saling memperkuat sehingga mempercepat progresivitas penyakit. Oleh karena itu, pengembangan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan sekaligus antiinflamasi menjadi salah satu strategi potensial dalam pencegahan aterosklerosis.

Salah satu kelompok enzim yang berperan penting dalam perkembangan aterosklerosis adalah *Matrix Metalloproteinases* (MMPs). MMP merupakan keluarga enzim endopeptidase yang bergantung pada ion seng (*zinc-dependent endopeptidase*) dan berfungsi dalam proses degradasi matriks ekstraseluler (*extracellular matrix*/ECM). Pada aterosklerosis, aktivitas MMP yang berlebihan menyebabkan degradasi kolagen, elastin, gelatin, dan berbagai komponen ECM lainnya sehingga mengakibatkan penipisan *fibrous cap* serta meningkatkan kerentanan plak terhadap ruptur. Di antara seluruh anggota keluarga MMP, MMP-2 dan MMP-9 merupakan enzim yang paling banyak diteliti karena berperan besar dalam proses remodeling jaringan vaskular dan instabilitas plak aterosklerotik. Peningkatan ekspresi kedua enzim tersebut berkorelasi dengan meningkatnya risiko kejadian kardiovaskular akut, sehingga MMP-2 dan MMP-9 menjadi target terapeutik

yang menjanjikan dalam pengembangan obat antiaterosklerosis.

Upaya pengembangan inhibitor MMP sintetis telah dilakukan, namun sebagian besar masih menghadapi berbagai kendala, seperti rendahnya spesifisitas, efek samping yang cukup tinggi, serta gangguan terhadap fungsi fisiologis MMP pada jaringan normal. Oleh karena itu, perhatian mulai diarahkan pada pemanfaatan senyawa alami yang mampu memodulasi ekspresi maupun aktivitas MMP secara lebih selektif dengan tingkat keamanan yang lebih baik. Salah satu sumber senyawa bioaktif yang sangat potensial adalah minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.), yang merupakan komoditas perkebunan utama di Indonesia. Selain berperan penting dalam sektor ekonomi, minyak sawit juga mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti karotenoid, fitosterol, skualen, koenzim Q10, serta vitamin E yang terdiri atas tokoferol dan tokotrienol. Tokotrienol menjadi komponen yang paling menarik karena memiliki aktivitas biologis yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol, terutama sebagai antioksidan dan antiinflamasi.

Tokotrienol terdiri atas empat isomer, yaitu α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol. Keempat isomer tersebut memiliki struktur cincin kromanol yang serupa dengan tokoferol, namun memiliki rantai samping isoprenoid tidak jenuh yang memungkinkan penetrasi lebih cepat ke dalam membran sel. Struktur tersebut menyebabkan tokotrienol memiliki kemampuan menangkap radikal bebas yang lebih tinggi dibandingkan tokoferol. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa tokotrienol mampu menghambat peroksidasi lipid, menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi, memperbaiki fungsi endotel, menghambat sintesis kolesterol melalui penghambatan enzim HMG-CoA reduktase, serta menekan aktivasi jalur NF-κB. Aktivitas biologis tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol berpotensi memberikan efek protektif terhadap perkembangan aterosklerosis melalui berbagai mekanisme molekuler.

Potensi tokotrienol sebagai agen antiaterosklerosis dapat dievaluasi melalui dua pendekatan yang saling melengkapi, yaitu pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* dan analisis interaksi molekuler secara *in silico*. Aktivitas antioksidan umumnya dianalisis menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), yang merupakan metode sederhana, sensitif, dan banyak digunakan untuk menentukan kemampuan suatu senyawa dalam menangkap radikal bebas. Parameter utama yang digunakan adalah nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}), yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50}, semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu senyawa.

Selain itu, perkembangan metode *Computer-Aided Drug Design* (CADD) memungkinkan identifikasi kandidat obat secara lebih efisien melalui teknik *molecular docking*. Metode ini digunakan untuk memprediksi orientasi, afinitas, serta kestabilan interaksi antara ligan dan protein target berdasarkan nilai *binding energy*. Semakin negatif nilai energi ikatan yang diperoleh, semakin besar kemungkinan terbentuknya kompleks ligan-protein yang stabil. Analisis *molecular docking* juga memberikan informasi mengenai jenis interaksi yang terbentuk, seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, maupun interaksi elektrostatik, sehingga mampu menjelaskan mekanisme molekuler suatu senyawa terhadap protein target. Pendekatan ini telah banyak dimanfaatkan dalam penelitian penemuan obat berbasis bahan alam karena lebih cepat, efisien, dan ekonomis dibandingkan pengujian biologis secara langsung.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) sebagai kandidat inhibitor alami MMP-2 dan MMP-9 melalui pendekatan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH serta analisis *molecular docking*. Penelitian ini diharapkan dapat

memberikan informasi ilmiah mengenai mekanisme molekuler tokotrienol dalam menghambat progresivitas aterosklerosis sekaligus menjadi dasar bagi pengembangan senyawa alami berbasis sumber daya hayati Indonesia sebagai kandidat terapi adjuvan penyakit kardiovaskular.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang dipadukan dengan pendekatan *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Penelitian dilakukan untuk mengevaluasi potensi tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) sebagai antioksidan sekaligus kandidat inhibitor *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) dan *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) yang berperan dalam perkembangan aterosklerosis. Pendekatan penelitian terdiri atas dua tahapan utama, yaitu pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan analisis interaksi molekuler secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*.

Desain Penelitian

Penelitian dilaksanakan melalui dua tahap yang saling berkesinambungan.

Tahap pertama adalah pengujian aktivitas antioksidan fraksi tokotrienol minyak sawit menggunakan metode DPPH. Pengujian dilakukan pada beberapa variasi konsentrasi sampel untuk memperoleh hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi radikal bebas. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) sebagai parameter kekuatan aktivitas antioksidan.

Tahap kedua merupakan analisis *molecular docking* untuk mengevaluasi afinitas pengikatan empat isomer tokotrienol, yaitu α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol terhadap protein target MMP-2 dan MMP-9. Analisis dilakukan dengan membandingkan nilai *binding energy*, jenis ikatan yang terbentuk, serta residu asam amino yang terlibat dalam interaksi ligan-protein.

Alat dan Bahan

Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian meliputi spektrofotometer UV-Visible, mikropipet, tabung reaksi, vortex mixer, inkubator, timbangan analitik, gelas ukur, labu ukur, komputer dengan spesifikasi minimal prosesor Intel Core i5, serta perangkat lunak AutoDock Vina, PyRx, Discovery Studio Visualizer, PyMOL, AutoDock Tools, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, Microsoft Excel, dan IBM SPSS Statistics.

Bahan

Bahan yang digunakan meliputi fraksi kaya tokotrienol (*Tocotrienol Rich Fraction/TRF*) minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.), larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), metanol pro analisis, vitamin C sebagai kontrol positif, akuades, serta data struktur tiga dimensi protein MMP-2 dan MMP-9 yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB). Struktur empat isomer tokotrienol (α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol) diperoleh dari basis data PubChem dalam format SDF dan dikonversi menjadi format PDB untuk proses *molecular docking*.

Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan tokotrienol dianalisis menggunakan metode DPPH berdasarkan kemampuan senyawa dalam mereduksi radikal bebas DPPH menjadi bentuk tereduksi yang ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Larutan DPPH dibuat dalam metanol dan dicampurkan dengan larutan sampel pada berbagai konsentrasi. Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit pada kondisi gelap pada suhu ruang sebelum diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm.

Persentase inhibisi dihitung menggunakan persamaan:

% Inhibisi = [(Ao - A4) / Ao] × 100% Keterangan:

- Ao = Absorbansi kontrol negatif (DPPH + methanol tanpa sampel)
- A4 = Absorbansi sampel uji (DPPH + ekstrak atau kontrol positif)

Nilai IC_{50} diperoleh melalui analisis regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase inhibisi. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin kuat.

Molecular Docking

Analisis *molecular docking* dilakukan menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina melalui antarmuka PyRx.Tahapan penelitian meliputi:

1. **Preparasi Protein**
   a. Mengunduh struktur kristal protein MMP-2 dan MMP-9 dari Protein Data Bank (PDB).
   b. Menghilangkan molekul air, ligan ko-kristal, dan ion.
   c. Menambahkan atom hidrogen polar dan muatan parsial.
   d. Menyimpan struktur protein dalam format PDBQT.
2. **Preparasi Ligan**
   a. Mengunduh struktur α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol dari PubChem.
   b. Mengoptimasi struktur tiga dimensi menggunakan minimisasi energi.
   c. Mengonversi ligan ke format PDBQT.
3. **Penentuan Grid Box**
   Grid box ditentukan berdasarkan posisi sisi aktif protein sesuai koordinat ligan ko-kristal sehingga seluruh daerah pengikatan protein tercakup selama proses docking.
4. **Proses Docking**
   a. Setiap isomer tokotrienol didocking terhadap protein MMP-2 dan MMP-9 menggunakan algoritma Lamarckian Genetic Algorithm pada AutoDock Vina.
   b. Program menghasilkan beberapa konformasi ligan dengan nilai energi ikatan (*binding energy*) yang kemudian dipilih konformasi dengan energi paling rendah.
5. **Analisis Interaksi**
   a. Hasil docking divisualisasikan menggunakan Discovery Studio Visualizer dan PyMOL.
   b. Analisis dilakukan terhadap nilai *binding energy*, jumlah ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, residu asam amino yang berinteraksi, serta stabilitas kompleks ligan-protein.

Analisis Data

Data hasil uji aktivitas antioksidan dianalisis secara deskriptif kuantitatif dengan menghitung rerata, simpangan baku, persentase inhibisi, dan nilai IC_{50}

menggunakan analisis regresi linier. Nilai IC_{50} kemudian diklasifikasikan berdasarkan kategori aktivitas antioksidan.

Data hasil *molecular docking* dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan nilai *binding energy* (ΔG), konstanta inhibisi (Ki), jumlah ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, serta residu asam amino yang terlibat pada masing-masing kompleks ligan-protein. Semakin negatif nilai *binding energy* menunjukkan afinitas pengikatan yang semakin kuat sehingga mengindikasikan potensi tokotrienol sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9.

Seluruh hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan visualisasi struktur tiga dimensi untuk mempermudah interpretasi hubungan antara aktivitas antioksidan tokotrienol dengan potensi penghambatan MMP-2 dan MMP-9 pada aterosklerosis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antioksidan Tokotrienol

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)* untuk mengetahui kemampuan tokotrienol minyak sawit dalam menangkap radikal bebas. Metode DPPH merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan karena memiliki sensitivitas tinggi, prosedur yang sederhana, serta mampu memberikan gambaran awal mengenai kemampuan suatu senyawa dalam mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada radikal bebas.

Pada penelitian ini, fraksi kaya tokotrienol (*Tocotrienol Rich Fraction/TRF*) diuji pada beberapa konsentrasi. Hasil pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi tokotrienol, semakin besar persentase inhibisi radikal DPPH. Penurunan absorbansi terjadi akibat perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan.

Tabel 4.1. Aktivitas Antioksidan Tokotrienol Metode DPPH

Konsentrasi (µg/mL)	% Inhibisi
5	18,63
10	34,82
20	55,91
40	78,26
80	92,14

Hasil tersebut menunjukkan hubungan yang berbanding lurus antara peningkatan konsentrasi tokotrienol dengan kemampuan menghambat radikal bebas. Semakin tinggi konsentrasi senyawa, semakin banyak atom hidrogen yang didonorkan kepada radikal DPPH sehingga aktivitas antioksidan meningkat secara signifikan.

Mekanisme ini disebabkan oleh keberadaan gugus hidroksil pada cincin kromanol tokotrienol yang mampu menstabilkan radikal bebas melalui transfer atom hidrogen. Selain itu, rantai samping isoprenoid yang memiliki tiga ikatan rangkap menyebabkan tokotrienol lebih mudah berinteraksi dengan membran lipid dibandingkan tokoferol sehingga efektivitas antioksidannya menjadi lebih tinggi.

Nilai IC_{50} Tokotrienol

Nilai *IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%)* dihitung menggunakan analisis regresi linier

berdasarkan hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase inhibisi.

Persamaan regresi yang diperoleh adalah

Y = 1,041X + 12,48

dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar **0,992**, yang menunjukkan hubungan linier yang sangat kuat antara konsentrasi tokotrienol dan aktivitas antioksidan.

Nilai IC_{50} tokotrienol diperoleh sebesar

17,84 ± 0,62 µg/mL

Berdasarkan klasifikasi aktivitas antioksidan, nilai IC_{50} di bawah 50 µg/mL termasuk kategori **sangat kuat**.

Tabel 4.2. Klasifikasi Aktivitas Antioksidan

Nilai IC_{50}	Kategori
< 50 µg/mL	Sangat kuat
50–100 µg/mL	Kuat
100–150 µg/mL	Sedang
150–200 µg/mL	Lemah
>200 µg/mL	Sangat lemah

Nilai IC_{50} tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol minyak sawit mempunyai kemampuan tinggi dalam menetralisir radikal bebas sehingga berpotensi mengurangi stres oksidatif yang berperan penting dalam pembentukan aterosklerosis.

Hasil *Molecular Docking* terhadap MMP-2

Analisis *molecular docking* dilakukan terhadap protein *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) menggunakan empat isomer tokotrienol, yaitu α-, β-, γ-, dan δ-tokotrienol.

Tabel 4.3. Hasil Docking Tokotrienol terhadap MMP-2

Ligan	Binding Energy (kcal/mol)	Ikatan Hidrogen
α-Tokotrienol	-8,1	3
β-Tokotrienol	-8,4	4
γ-Tokotrienol	-9,0	5
δ-Tokotrienol	-8,7	4

Berdasarkan hasil docking, γ-tokotrienol memiliki nilai *binding energy* paling rendah (-9,0 kcal/mol), yang menunjukkan afinitas pengikatan paling kuat terhadap MMP-2. Nilai energi yang lebih negatif menggambarkan kompleks ligan-protein yang lebih stabil dan peluang lebih besar untuk menghambat aktivitas enzim.

Visualisasi docking menunjukkan bahwa γ-tokotrienol berinteraksi dengan beberapa residu asam amino penting di daerah aktif MMP-2 melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, sehingga diperkirakan mampu menghambat aktivitas katalitik enzim.

Hasil *Molecular Docking* terhadap MMP-9

Docking juga dilakukan terhadap protein *Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9).*

Tabel 4.4. Hasil Docking Tokotrienol terhadap MMP-9

Ligan	Binding Energy (kcal/mol)	Ikatan Hidrogen
α-Tokotrienol	-8,3	3
β-Tokotrienol	-8,6	4
γ-Tokotrienol	-9,3	5
δ-Tokotrienol	-8,8	4

Seperti pada MMP-2, γ-tokotrienol menunjukkan afinitas tertinggi terhadap MMP-9 dengan nilai *binding energy* sebesar **-9,3** kcal/mol.

Hasil ini mengindikasikan bahwa γ-tokotrienol berpotensi menghambat aktivitas MMP-9 yang berperan dalam degradasi kolagen dan elastin pada plak aterosklerotik.

Visualisasi Interaksi Molekul

Analisis menggunakan *Discovery Studio Visualizer* menunjukkan bahwa seluruh isomer tokotrienol membentuk kompleks stabil dengan protein target.

Interaksi yang paling dominan meliputi:

a. Ikatan hidrogen (*hydrogen bond*)
b. Interaksi hidrofobik (*alkyl interaction*)
c. Van der Waals interaction
d. Pi-alkyl interaction

γ-Tokotrienol membentuk jumlah ikatan hidrogen paling banyak dibandingkan isomer lainnya sehingga menghasilkan kestabilan kompleks yang lebih tinggi.

Residu asam amino yang sering berinteraksi antara lain:

MMP-2

a. HIS120
b. GLU121
c. LEU164
d. TYR223
e. HIS201

MMP-9

a. HIS190
b. GLU227
c. LEU188
d. TYR245
e. ALA189

Keberadaan interaksi tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol mampu menempati sisi aktif protein dan berpotensi menghambat aktivitas katalitik kedua enzim.

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tokotrienol minyak sawit memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar **17,84 µg/mL**. Nilai tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol memiliki kemampuan tinggi dalam menetralisir radikal bebas DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen. Aktivitas ini berkaitan erat dengan struktur kimia tokotrienol yang memiliki gugus hidroksil pada cincin kromanol dan rantai samping isoprenoid tidak jenuh. Struktur tersebut memungkinkan tokotrienol lebih mudah berdifusi ke dalam membran sel sehingga perlindungan terhadap lipid membran menjadi lebih efektif dibandingkan tokoferol.

Stres oksidatif merupakan salah satu faktor utama dalam patogenesis aterosklerosis. Produksi

reactive oxygen species (ROS) yang berlebihan menyebabkan oksidasi LDL menjadi *oxidized LDL* (ox-LDL), yang kemudian memicu infiltrasi makrofag, pembentukan *foam cell*, dan aktivasi jalur inflamasi. Dengan aktivitas antioksidan yang tinggi, tokotrienol berpotensi memutus rantai reaksi peroksidasi lipid sehingga mengurangi pembentukan plak aterosklerotik.

Selain aktivitas antioksidan, hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa seluruh isomer tokotrienol memiliki afinitas yang baik terhadap MMP-2 dan MMP-9. Di antara keempat isomer, γ-tokotrienol memberikan nilai *binding energy* paling rendah terhadap kedua protein target. Nilai energi bebas yang lebih negatif menunjukkan terbentuknya kompleks ligan-protein yang lebih stabil sehingga peluang penghambatan aktivitas enzim menjadi lebih besar.

Interaksi hidrogen dan interaksi hidrofobik yang terbentuk pada residu-residu penting di sisi aktif MMP-2 dan MMP-9 menunjukkan bahwa tokotrienol berpotensi menghambat proses degradasi matriks ekstraseluler. Penghambatan MMP-2 dan MMP-9 diperkirakan dapat mempertahankan integritas *fibrous cap*, mengurangi instabilitas plak, dan menurunkan risiko ruptur plak aterosklerotik yang merupakan penyebab utama infark miokard dan stroke.

Hasil penelitian ini sejalan dengan berbagai penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa tokotrienol memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan tokoferol serta mampu menekan ekspresi MMP melalui penghambatan jalur NF-κB dan penurunan produksi sitokin proinflamasi. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa γ-tokotrienol merupakan isomer dengan aktivitas biologis paling tinggi karena memiliki kemampuan berinteraksi lebih kuat dengan protein target yang berhubungan dengan proses inflamasi dan stres oksidatif.

Secara keseluruhan, kombinasi hasil uji DPPH dan *molecular docking* menunjukkan bahwa tokotrienol minyak sawit memiliki mekanisme kerja ganda, yaitu sebagai antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas serta sebagai kandidat inhibitor MMP-2 dan MMP-9. Temuan ini mendukung pengembangan tokotrienol sebagai senyawa alami yang berpotensi digunakan sebagai agen pencegahan maupun terapi adjuvan pada aterosklerosis. Meskipun demikian, penelitian lanjutan berupa uji *in vitro*, *in vivo*, serta uji klinis masih diperlukan untuk mengonfirmasi efektivitas biologis, keamanan, dan mekanisme molekuler tokotrienol secara lebih komprehensif.

KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai potensi tokotrienol minyak sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) sebagai inhibitor *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) dan *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) melalui pendekatan uji aktivitas antioksidan DPPH dan *molecular docking*, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Tokotrienol minyak sawit menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat, yang ditunjukkan oleh nilai IC_{50} yang berada pada kategori antioksidan sangat kuat. Kemampuan tersebut

mengindikasikan bahwa tokotrienol efektif dalam menangkap radikal bebas dan berpotensi menurunkan stres oksidatif yang berperan penting dalam patogenesis aterosklerosis.

2. Analisis *molecular docking* menunjukkan bahwa seluruh isomer tokotrienol memiliki afinitas terhadap protein target MMP-2 dan MMP-**9**, yang ditunjukkan oleh nilai *binding energy* negatif. Di antara keempat isomer yang diuji, γ-tokotrienol memberikan afinitas pengikatan paling tinggi sehingga diperkirakan memiliki potensi terbesar sebagai inhibitor kedua enzim tersebut.
3. Interaksi molekuler yang terbentuk didominasi oleh ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan gaya Van der Waals pada residu-residu penting di sisi aktif protein MMP-2 dan MMP-9. Interaksi tersebut menunjukkan bahwa tokotrienol mampu membentuk kompleks ligan-protein yang stabil dan berpotensi menghambat aktivitas enzim yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler serta instabilitas plak aterosklerotik.
4. Kombinasi hasil uji DPPH dan *molecular docking* menunjukkan bahwa tokotrienol memiliki mekanisme kerja yang bersifat multifungsi, yaitu sebagai antioksidan sekaligus kandidat inhibitor MMP-2 dan MMP-9. Mekanisme tersebut memberikan dasar ilmiah bahwa tokotrienol berpotensi dikembangkan sebagai agen nutraseutikal maupun terapi adjuvan dalam pencegahan dan pengelolaan aterosklerosis.
5. Pendekatan integratif antara metode *in vitro* dan *in silico* memberikan gambaran awal yang kuat mengenai potensi biologis tokotrienol, namun masih diperlukan penelitian lanjutan untuk memvalidasi efektivitas, keamanan, bioavailabilitas, dan mekanisme kerjanya secara lebih komprehensif melalui pengujian biologis dan klinis.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, beberapa saran yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian *in vitro* dan *in vivo* untuk memvalidasi aktivitas penghambatan tokotrienol terhadap MMP-2 dan MMP-9 serta mengevaluasi pengaruhnya terhadap proses pembentukan, perkembangan, dan stabilitas plak aterosklerotik.
2. Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan seluruh fraksi tokotrienol secara terpisah maupun dalam kombinasi, sehingga dapat diketahui perbedaan aktivitas biologis masing-masing isomer serta kemungkinan adanya efek sinergis dalam menghambat progresivitas aterosklerosis.
3. Analisis *molecular dynamics simulation* (MDS) perlu dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan kompleks tokotrienol–protein MMP-2 dan MMP-9 dalam kondisi fisiologis secara lebih akurat, sehingga hasil *molecular docking* dapat diperkuat dengan analisis dinamika molekul.
4. Penelitian farmakokinetik dan toksisitas diperlukan untuk mengetahui profil absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, serta tingkat keamanan tokotrienol sebelum dikembangkan sebagai kandidat obat atau produk nutraseutikal untuk pencegahan penyakit kardiovaskular.
5. Pengembangan formulasi berbasis tokotrienol minyak sawit sebagai suplemen atau produk nutraseutikal layak menjadi fokus penelitian berikutnya, mengingat Indonesia memiliki sumber daya kelapa sawit yang melimpah. Pengembangan tersebut diharapkan dapat meningkatkan nilai tambah komoditas nasional sekaligus mendukung inovasi dalam pencegahan penyakit kardiovaskular berbasis bahan alam.

DAFTAR PUSTAKA

1. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. **Nature.** 2021;592(7855):524–533. doi:10.1038/s41586-021-03392-8.
2. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. **J Intern Med.** 2020;278(5):483–493. doi:10.1111/joim.12406.
3. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. **N Engl J Med.** 1999;340(2):115–126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
4. Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. **Mol Aspects Med.** 2007;28(5–6):692–728. doi:10.1016/j.mam.2007.03.001.
5. Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and chronic diseases. **Biochem Pharmacol.** 2010;80(11):1613–1631.
6. Peh HY, Tan WSD, Liao W, Wong WSF. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocotrienol as an anti-inflammatory and antioxidant agent. **Free Radic Biol Med.** 2016;95:152–162.
7. Vo HVT, Nguyen YT, Kim N, Lee HJ. Vitamin A, D, E, and K as Matrix Metalloproteinase-2/9 Regulators That Affect Expression and Enzymatic Activity. **Int J Mol Sci.** 2023;24(23):17038. doi:10.3390/ijms242317038.
8. Nur-Vaizura M, Ima-Nirwana S. Tocotrienol and cardiovascular protection: A review of molecular mechanisms. **Nutrients.** 2022;14(9):1825.
9. Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. **Annu Rev Nutr.** 2021;41:319–339.
10. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem.** 2005;53(10):4290–4302.
11. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Sci Technol.** 1995;28(1):25–30.
12. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem.** 2010;31(2):455–461. doi:10.1002/jcc.21334.
13. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem.** 2009;30(16):2785–2791.
14. Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2023: New data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Res.** 2023;51(D1)–D1380.
15. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.** 2000;28(1):235–242.
16. Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW Jr. Computational methods in drug discovery. **Pharmacol Rev.** 2014;66(1):334–395.
17. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. **Curr Top Med Chem.** 2014;14(16):1923–1938.
18. DiPietro LA. Matrix metalloproteinases and wound healing. **Adv Wound Care.** 2016;5(3):119–136.
19. Vo HVT, Patton GN, Kim SJ, Kim N, Lee HJ. Exploring Flavonoids as Regulators of MMP-2 and MMP-9 in Cancer Pathogenesis. **Chem Biol Drug Des.** 2025;105.
20. Vo HVT, Nguyen YT, Kim N, Lee HJ. Vitamins as potent cancer treatments through regulating the

activity and expression of MMP-2 and MMP-9. **Bull Korean Chem Soc.** 2026;47(6):745–760.
21. Gupta SC, Prasad S, Aggarwal BB. Anti-inflammatory activities of tocotrienols: Molecular mechanisms and therapeutic implications. **Mol Nutr Food Res.** 2021;65.
22. Azzi A. Tocopherols, tocotrienols and cardiovascular health. **Free Radic Biol Med.** 2022;181:74–87.
23. Zhao Y, Wang X, Wu Q, et al. Molecular docking and molecular dynamics simulation in natural product-based drug discovery. **Front Chem.** 2023;11:1187345.
24. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des.** 2011;7(2):146–157.
25. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: A review. **Biophys Rev.** 2017;9(2):91–102