

**LAPORAN KEMAJUAN
PENELITIAN DASAR**



Analisis In Silico Potensi Fertilitas Dari Senyawa Bioaktif Nigella Sativa

TIM PENGUSUL

Amirul Amalia, SSiT., M.Kes	NIDN 0723018301
Prof Dr dr. Hendy Hendarto Sp.O.G	NIDN 8829700016
Dr Arifa Mustika M.Si	NIDN 0015097006

**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH LAMONGAN
FAKULTAS ILMU KSEHATAN
PROGRAM STUDI KEBIDANAN**

2023

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Analisis In Silico Potensi Fertilitas Dari
Senyawa Bioaktif Nigella Sativa

Bidang Penelitian : Kebidanan

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Amirul Amalia., SSiT., M.Kes
b. NIP/NIDN : 0723018301
c. Jabatan/Golongan : Lektor
d. Fakultas/Program Studi : D3 Kebidanan
e. No HP : 081390793698
f. Alamat Email : amirul2383@gmail.com

Anggota Tim (1)

a. Nama : Hendy Hendarto
b. NIDN : 8829700016
c. Fakultas/Program Studi : Ilmu Kedokteran/ S3 Kedokteran

Anggota Tim (2)

a. Nama : Arifa Mustika
b. NIDN : 0015097006
c. Fakultas/Program Studi : Ilmu Kedokteran/ S3 Kedokteran

Mahasiswa (1)

a. Nama : Niken Dwi Febrianti
b. NIM : 2202021851
c. Fakultas/Program Studi : Ilmu Kesehatan / D3 Kebidanan

Mahasiswa (2)

a. Nama : Annisa Ilmi Nur Vadilah
b. NIM : 2202080025
c. Fakultas/Program Studi : Ilmu Kesehatan / S1 Kebidanan

Biaya Penelitian : Rp. 17.000.000.-

Lamongan, 7 Juni 2023

Mengetahui:
Kepala LPPM

Ketua Tim

Abdul Rokhman, , S.Kep.,Ns.M.Kep
NPP. 19881020 201211056

Amirul Amalia., SSiT., M.Kes
NIDN. 0723018301

RINGKASAN

Latar belakang : Kesuburan merupakan kemampuan untuk menjadi hamil. Hingga saat ini masih banyak ditemukan kejadian ketidaksuburan. Hal ini disebabkan gangguan folikulogenesis. Rendahnya GDF9 dan ESR1 dapat digunakan sebagai biomarker pada gangguan folikulogenesis. *Nigella sativa* merupakan tanaman yang memiliki khasiat obat sebagai penawar racun, melindungi toksisitas pada paru-paru, jantung, hati, saluran pencernaan dan sistem reproduksi.

Tujuan dan ruang lingkup : Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi potensi senyawa bioaktif *Nigella sativa* sebagai aktivator protein GDF9 dan ESR1 pada kesuburan dalam pendekatan studi insilico. Penelitian ini termasuk dalam bidang fokus kesehatan dengan tema studi bioinformatika, yang melibatkan identifikasi dan karakterisasi protein target dengan memperoleh struktur 3D dari database seperti Protein Data Bank (PDB) atau melalui pemodelan homologi. Penelitian ini untuk menentukan apakah senyawa dari *Nigella sativa* memiliki efektivitas sebagai aktivator potensial dibandingkan dengan agonis atau inhibitor yang sudah diketahui. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru dalam pengembangan terapi berbasis fitokimia untuk meningkatkan kesuburan, serta menjadi dasar bagi studi lanjutan melalui pengujian in vitro dan in vivo.

Metode : Semua ligan dari ekstrak *Nigella sativa* dari penelitian sebelumnya, dan preparat protein masing-masing diambil dari database bank data Pubchem. Konversi file *sdf* menjadi *pdb* pada ligan dilakukan melalui software OpenBabel v2.3.1. Sifat *drug-like molecule* pada senyawa kimia dari *Nigella sativa* diidentifikasi melalui uji druglikeness pada server SwissADME dan menggunakan software PyRx v9.9.0, software LigPlot+ v.2.2, serta software PyMol v2.5 untuk menganalisis dan memvisualisasikan potensi senyawa *Nigella sativa* terhadap protein GDF9 dan ESR1.

Target publikasi : publikasi Jurnal JPPRes (SCOPUS). Link jurnal :

<https://jppres.com/jppres/>

PRAKATA

Puji syukur Kehadirat Allah SWT karena atas rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga peneliti dapat menyampaikan Laporan Kemajuan Penelitian dengan judul “Analisis In Siilico Potensi Fertilitas Dari Senyawa Bioaktif Nigella Sativa” Peneliti menyampaikan ucapan terima kasih kepada berbagai pihak atas kerjasama dalam penyusunan laporan ini, diantaranya:

1. Prof. Dr. Abdul Azis Alimul Hidayat, S. Kep., Ns. M. Kes., selaku Rektor Universitas Muhammadiyah Lamongan.
2. Abdul Rahman, S. Kep., Ns., M. Kep. selaku ketua LPPM Universitas Muhammadiyah Lamongan.
3. Arifal Aris, S. Kep., Ns., M.Kes, selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Lamongan.
4. Hj. Andri Tri Kusumaningrum, S.Si.T., M. Kes., selaku ketua program studi D3 Kebidanan Fakultas Ilmu Kesehatan
5. Rektor Universitas Muhammadiyah Lamongan yang telah memberikan kesempatan untuk bermitra dalam kegiatan penelitian.

Peneliti menyadari bahwa Laporan Kemajuan Penelitian masih jauh dari kesempurnaan, maka peneliti mengharapkan kritik dan saran membangun dari semua pihak. Peneliti berharap Laporan Kemajuan Penelitian ini selesai sesuai dengan batas waktu yang telah ditentukan sehingga penelitian ini bermanfaat bagi banyak pihak. Akhirnya peneliti mohon maaf yang sebesar-besarnya apabila terdapat kesalahan selama penyusunan laporan.

Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
BAB 4 METODE PENELITIAN	9
BAB 5 HASIL YANG DICAPAI	10
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	11
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	12
LAMPIRAN-LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 .Rencana Target Capaian Tahunan Penelitian Inovasi Unggulan
Perguruan Tinggi

Table 5.1. *Nigella sativa* ligand sample preparation from PubChem database

Table 5.2. The result of druglikeness analysis

Table 5. 3. The docking result of *Nigella sativa* compound-targetTable 5.3. The
results of chemical interaction analysis

Tabel 6.1 rencana tahapan

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Histologi ovarium tikus dengan pewarnaan HE (54). Keterangan:

Penampang melintang histologis ovarium tikus betina, pembesaran 400x

Gambar 2.2 Folikel primordial ovarium (55).

Gambar 2.3 Folikel primer ovarium (55).

Gambar 2.4 Folikel sekunder atau folikel preantral dari ovarium wanita usia 30 tahun (55).

Gambar 2.5 Folikel graff ovarium (55).

Gambar 5.1. Ligand structural visualization

Gambar 5.2 Protein structural visualization

Gambar 5.3. Targets-ligand structural visualization from the docking simulation

Gambar 5.4. The visualization of molecular interaction

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 HKI
- Lampiran 2 Artikel Ilmiah

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fertilitas adalah kapasitas untuk membentuk kehamilan (Zegers-Hochschild et al., 2017). Setiap pasangan pasti mempunyai keinginan untuk hamil dan memiliki keturunan. Namun pada kenyataannya masih banyak ditemukan pasangan yang tidak dapat hamil setelah menikah. Kegagalan untuk mencapai kehamilan setelah 12 bulan atau lebih hubungan seksual tanpa alat kontrasepsi secara teratur disebut infertilitas (Datta et al., 2016). Infertil pada pasangan usia subur di seluruh dunia diperkirakan sekitar 50-80 juta. Di Indonesia, 10 -15% jumlah penduduk mengalami infertilitas. Prevalensi wanita usia subur yang mengalami infertilitas diperkirakan mencapai 6.08% dan tertinggi terdapat pada usia 20-24 tahun sebanyak 21,3% (Halimah & Winarni, 2018). Infertilitas merupakan masalah kesehatan masyarakat karena mempengaruhi jutaan wanita di seluruh dunia. Salah satu penyebab infertilitas adalah gangguan folikulogenesis. (Patel et al., 2015).

Ovarium berisi folikel primordial yang sangat banyak. Beberapa dari folikel ini memasuki fase pertumbuhan dan berkembang melalui tahap folikel primer dan sekunder. Sel granulosa folikel berkembang biak untuk mengembangkan struktur berlapis-lapis selama perkembangan folikel. Kemudian, terbentuk rongga berisi cairan di dalam folikel pada saat tahap folikel antral. Rongga berisi cairan ini disebut antrum. Pada folikel antral, sel granulosa berpisah membentuk sel kumulus granulosa yang membungkus oosit, dan sel granulosa mural yang membentuk lapisan dalam dinding folikel (Wigglesworth et al., 2015). Komunikasi dua arah antara oosit dan sel granulosa diperlukan untuk fungsi ovarium dan kesuburan (Alam et al., 2018). Sel granulosa memasok nutrisi, metabolit, dan sinyal molekuler ke oosit, sementara oosit meningkatkan proliferasi, diferensiasi, dan fungsi sel granulosa. Oosit memainkan peran penting dalam regulasi perkembangan folikel (Matzuk et al., 2002). Oosit diperlukan untuk pembentukan folikel primordial awal dan mengatur karakteristik dan fungsi spesifik antara sel kumulus granulosa dan sel granulosa mural. Selama pematangan, oosit mengeluarkan faktor yang menginduksi ekspansi kumulus yaitu

GDF-9 (Soyal et al., 2000).

GDF-9 adalah faktor penting yang diturunkan dari oosit yang mengatur fungsi ovarium (Emori & Sugiura, 2014). GDF-9 memiliki efek bervariasi pada sel teka dan sel granulosa. GDF-9 diketahui menstimulasi diferensiasi sel granulosa, termasuk menginduksi reseptor LH dan steroidogenesis (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013a)(Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013b). Hasil penelitian Fritz, menyatakan tikus yang mengalami defisiensi GDF-9 ditemukan infertile karena perkembangan folikuler tidak dapat berjalan melebihi tahap folikel primordial (Fritz, 2011). Selain GDF-9, ada protein yang penting dalam proses folikulogenesis yaitu ESR 1. ESR 1 memainkan peran kunci dalam reproduksi dengan berfungsi sebagai mediator hormone estrogen. Hasil penelitian terdahulu mengatakan adanya gangguan ESR 1 dapat menyebabkan infertilitas (Arnal et al., 2017; Karim Rumi et al., 2017)

Nigella sativa diakui sebagai tanaman ajaib, kaum muslim menyebut tanaman ini sebagai *Habbatus Sauda*, *Alhabahat Isawda* dan *Alkamoun Alaswad* (Sahak et al., 2016). *Nigella sativa* juga diketahui memiliki khasiat obat sebagai penawar racun, melindungi terhadap toksisitas pada beberapa organ, termasuk otak, ginjal, paru-paru, hati, jantung, saluran pencernaan dan sistem reproduksi (Hannan, M Abdul; Rahman, M Ataur; Sohag, Abdullah Al Mamun; Uddin, Jamal; Dash, Raju ; Sikder, Mahmudul Hasan; Rahman, Saidur; Munni, Yeasmin Akter; Timalisina & Mohibbullah; Sarker, 2021). Sejauh ini, penelitian tentang *Nigella sativa* sebagai potensi fertilitas yang mengaktifasi GDF-9 dan ESR 1 masih belum ada. Jadi, penelitian ini bertujuan untuk memprediksi potensi fertilitas dari senyawa bioaktif *Nigella sativa* dengan meningkatkan aktivitas GDF-9 dan ESR 1.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana karakteristik struktur dan peran biologis protein GDF9 dan ESR1 dalam regulasi kesuburan?
- b. Apa saja senyawa bioaktif yang terkandung dalam *Nigella sativa* yang berpotensi berinteraksi dengan GDF9 dan ESR1?
- c. Sejauh mana stabilitas kompleks ligand-protein hasil docking dalam lingkungan biologis berdasarkan simulasi dinamika molekuler?

- d. Bagaimana prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas (ADMET) dari senyawa bioaktif *Nigella sativa* yang memiliki potensi sebagai aktivator GDF9 dan ESR1?

1.3 Target Temuan

Penemuan hasil bahwa senyawa bioaktif *Nigella sativa* memiliki potensi sebagai aktivator protein GDF9 dan ESR1 pada kesuburan wanita dalam pencegahan infertilitas.

1.4 Rencana Target Capaian Tahunan Penelitian Dasar

Tabel 2.1 : Rencana Target Capaian Tahunan Penelitian Inovasi Unggulan Perguruan Tinggi

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian
			TS ¹⁾
1.	Publikasi Ilmiah ²⁾	Internasional bereputasi	tidak ada
		Nasional terakreditasi	<i>accepted</i>
2.	Pemakalah dalam temu ilmiah ³⁾	Internasional	tidak ada
		Nasional	tidak ada
3.	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah ⁴⁾	Internasional	tidak ada
		Nasional	tidak ada
4.	<i>Visiting Lecturer</i> ⁵⁾	Internasional	tidak ada
		Paten	tidak ada
		Paten sederhana	tidak ada
		Hak cipta	tidak ada
5.	Hak Kekayaan Intelektual ⁶⁾	Merek dagang	tidak ada
		Rahasia dagang	tidak ada
		Desain produk industri	tidak ada
		Indikasi geografis	tidak ada
		Perlindungan varietas	tidak ada
		Perlindungan topografi	tidak ada
6.	Teknologi Tepat Guna ⁷⁾		tidak ada
7.	Buku Ajar (ISBN) ⁸⁾		tidak ada

- TS = Tahun sekarang (tahun pertama penelitian)
- Isi dengan tidak ada, draf, *submitted*, *reviewed*, *accepted*, atau *published*
- Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan
- Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan
- Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan
- Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau *granted*
- Isi dengan tidak ada, draf, produk, atau penerapan
 - Isi dengan tidak ada, draf, proses *editing*, atau sudah terbit

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Senyawa atau produk metabolit sekunder dari biji jintan hitam yang paling dominan adalah minyak atsiri dan asam lemak. Salah satu senyawa yang terdapat pada minyak atsiri adalah monoterpen. Komponen utama yang termasuk golongan monoterpen adalah *α-thujene*, *p-cymene*, *γ-terpinene*, *fenchone*, *dihydrocarvone*, *thymoquinone*, *thymohydroquinone*, *carvacrol* dan komposisi dari senyawa senyawa tersebut akan berbeda-beda tergantung usia biji jintan hitam (Desai et al., 2015).

Biosintesis monoterpen ini akan menghasilkan produk berupa *γ-terpinen* yang nanti akan dibiosintesis menjadi senyawa *thymoquinone*. *Thymoquinone* merupakan produk metabolisme sekunder yang terbentuk dari *geranyl diphosphate* yang dihubungkan ke *γ-terpinen* kemudian diaromatisasi ke dalam *p-cymene* dan diikuti dengan hidroksilasi *carvacrol* untuk menjadi *thymohydroquinone* dan *thymoquinone*, sedangkan hidroksilasi *thymol* sebagai jalur biosintesis alternatif (Botnick et al., 2012).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *thymoquinone* dari jintan hitam telah menunjukkan berbagai efek terapeutik. Malondialdehid (MDA) adalah aldehida reaktif dan merupakan salah satu dari banyak spesies elektrofili reaktif yang menyebabkan stres toksik dalam sel dan membentuk protein kovalen. Produksi aldehida ini digunakan sebagai biomarker untuk mengukur tingkat stres oksidatif dalam suatu organisme. Superoksida diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan menyebabkan berbagai jenis kerusakan sel (Desai et al., 2015). Superoksida Dimutase (SOD) merupakan antioksidan endogen yang bekerja dengan mengatur kadar ROS. SOD berperan penting dalam melindungi sel terhadap stres oksidatif (Sharifi-Rad et al., 2020). Dalam sebuah penelitian tentang efek ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap kadar MDA didapatkan hasil kadar MDA berkurang secara signifikan pada tikus yang diberi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dibandingkan dengan tikus yang tidak diberi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*). Selain itu, kadar SOD meningkat secara signifikan ketika diberi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) (Desai et al.,

2015).

Pengaruh *thymoquinone* adalah melalui mekanisme antioksidan dan antiapoptosis. *Thymoquinone* meningkatkan level transkrip gen GPx1 untuk menurunkan level ROS. Di sisi lain, *thymoquinone* menurunkan ekspresi gen Bax sebagai aktivator apoptosis dan rasio Bax/Bcl2 sebagai indeks apoptosis dan meningkatkan efek merugikan dari PCO. Peningkatan generasi ROS dapat mempengaruhi aktivitas mitokondria, mengakibatkan penurunan folikulogenesis. Antioksidan adalah salah satu cara terbaik untuk meningkatkan folikulogenesis ovarium. *Thymoquinone* dapat memulihkan folikulogenesis dan hormon seksual dengan merangsang sistem antioksidan dan menghambat jalur apoptosis, sebagaimana dibuktikan dengan berkurangnya jumlah folikel atretik dan sejumlah besar folikel unilaminar, multilaminar, antral dan graffian (Alaee et al., 2023).

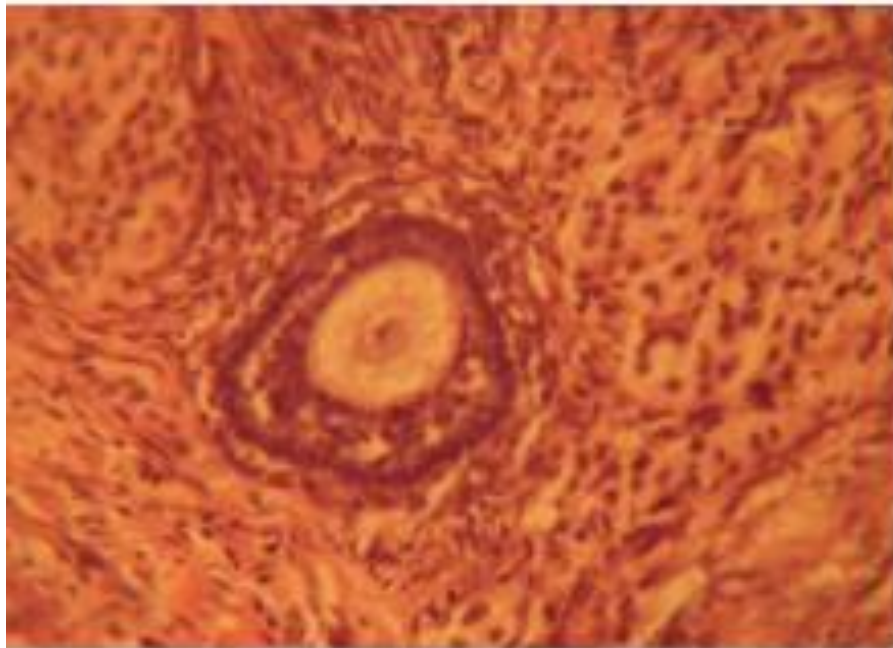
Nigella sativa memiliki efek perlindungan pada cadangan ovarium tikus yang diobati dengan cisplatin. Kandungan antioksidan pada jintan hitam (*Nigella sativa*) mencegah hilangnya folikel juga meningkatkan kesuburan. Menjaga radikal bebas tetap rendah di ovarium penting untuk meningkatkan kelangsungan cadangan ovarium. Pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang kaya *thymoquinone* memiliki efek antiproliferasi dan proapoptosis pada sel karsinoma, tetapi bersifat protektif terhadap sel sehat pada ovarium dan organ lainnya (Sukatendel et al., 2021).

2.2 Konsep Dasar Folikulogenesis

Fungsi reproduksi wanita memiliki siklus aktivitas yang ditandai dengan pertumbuhan dan perkembangan dari folikel yang dikendalikan oleh hipotalamus. Proses pertumbuhan dan perkembangan folikel dinamakan folikulogenesis, merupakan proses yang sangat panjang dan membutuhkan waktu kira-kira 1 tahun untuk folikel primordial tumbuh dan berkembang mencapai stadium ovulasi. Folikulogenesis terjadi di dalam kortek ovarium dengan dua fase yaitu fase preantral dan fase antral. Fase preantral ditandai dengan pertumbuhan dan diferensiasi dari oosit. Fase antral ditandai dengan peningkatan pesat ukuran folikel, dari 400 μm menjadi kira-kira 25 mm (52).

Pada wanita sel germinativum primordial berdiferensiasi menjadi oogonia,

mengalami sejumlah pembelahan mitotik dan pada akhir bulan ketiga sel ini tersusun dalam kelompok yang dikelilingi oleh lapisan sel epitel gepeng. Selama beberapa bulan kemudian jumlah oogonia meningkat pesat, dan pada akhir bulan kelima perkembangan pra natal, jumlah total sel germinativum di ovarium mencapai maksimal yang diperkirakan berjumlah 7 juta. Jumlah total oosit primer saat lahir diperkirakan bervariasi dari 600000 sampai 800000. Selama masa anak-anak sebagian besar oosit menjadi atretik, hanya sekitar 400000 yang ada pada permulaan pubertas dan kurang dari 500 yang akan diovasikan (53).

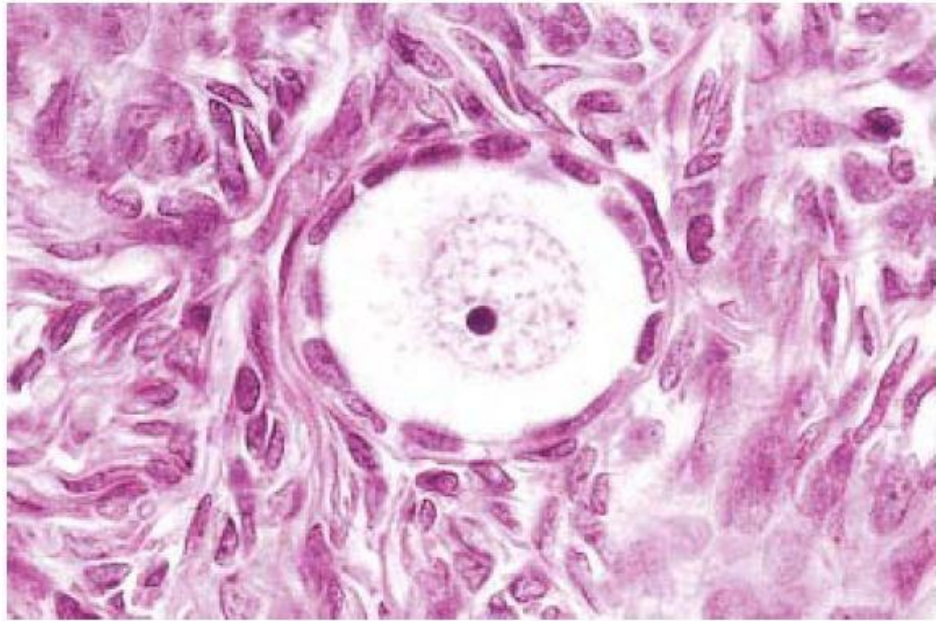


Gambar 2.1 Histologi ovarium tikus dengan pewarnaan HE (54).

Keterangan: Penampang melintang histologis ovarium tikus betina, pembesaran
400x

2.1.2 Folikel primordial

Folikel primordial merupakan unit dasar terpenting reproduksi dari ovarium karena dari folikel ini akan berkembang menjadi folikel dominan dan akan memasuki siklus menstruasi. Secara histologis, folikel primordial terdiri dari satu oosit primer berukuran kecil (diameter $\sim 25\mu\text{m}$) yang dikelilingi oleh satu lapisan sel epitel gepeng.



Gambar 2.2 Folikel primordial ovarium (55).

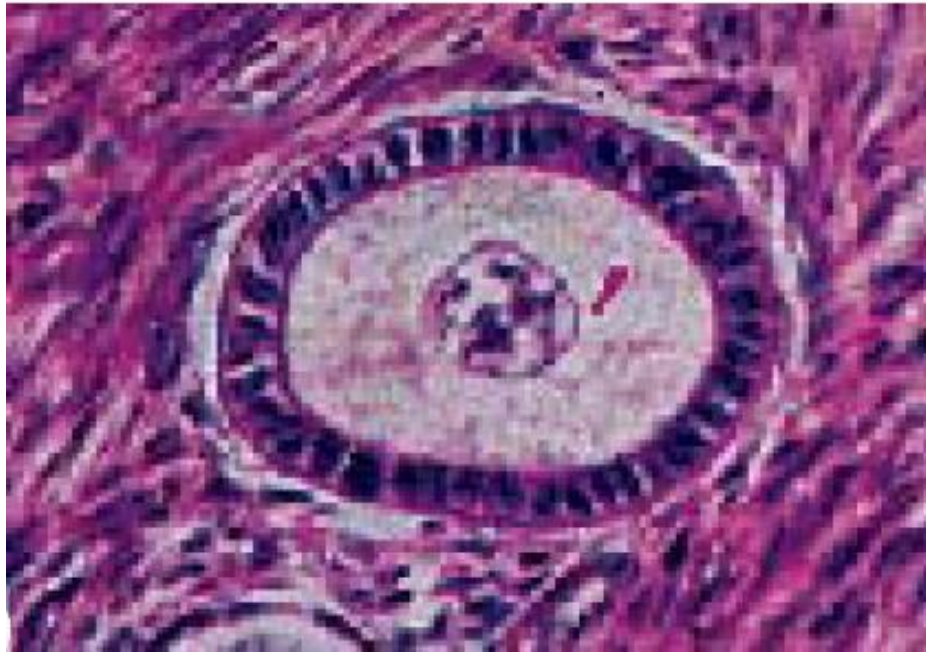
Keterangan : Folikel primordial dalam kortikal stroma. Satu lapisan sel epitel folikular pipih mengelilingi oosit dengan inti yang besar dan nukleolus menonjol. *Ooplasm* tersebut tidak berwarna. Pewarnaan: hematoxylin-eosin, perbesaran: $\times 500$

Semua oosit yang berpartisipasi dalam siklus reproduksi wanita selama hidupnya telah ada dalam ovarium sejak lahir. Folikel primordial dibentuk pada saat masa fetus diantara umur gestasi bulan ke-6 dan ke-9. Jumlah paling banyak pada saat sebelum lahir dan jumlah folikel primordial dalam ovarium wanita berhubungan dengan masa reproduksi wanita atau *ovary reserve* (OR). Penurunan kesuburan berlangsung bersamaan dengan semakin menurunnya jumlah folikel primordial di ovarium. Dalam proses perkembangannya dari folikel primordial sampai terjadi ovulasi folikel tersebut melalui proses pematangan melalui tiga stadium: stadium primer, stadium sekunder atau preantral dan stadium preovulasi atau antral atau folikel graff.

2.1.3 Folikel primer

Folikel primer ditandai dengan adanya sel folikuler yang membentuk lapisan sel granulosa disekitar oosit dan adanya zona pelusida

yang jelas. Proses perkembangan utama yang terjadi pada folikel primer termasuk ekspresi reseptor FSH dan pertumbuhan serta diferensiasi oosit. Oosit primer ini rentan terhadap kerusakan sewaktu menjadi tua sehingga resiko memiliki anak dengan kelainan kromosom meningkat seiring usia ibu.



Gambar 2.3 Folikel primer ovarium (55).

Keterangan : Sel-sel epitel folikel berlapis tunggal yang kuboid atau kolumnar. Sebuah membran basement (zona pelusida) berada antara membran plasma oosit dan epitel folikular. Sebuah membran basal dan selubung jaringan ikat (teka folliculi) menyelimuti folikel primer.

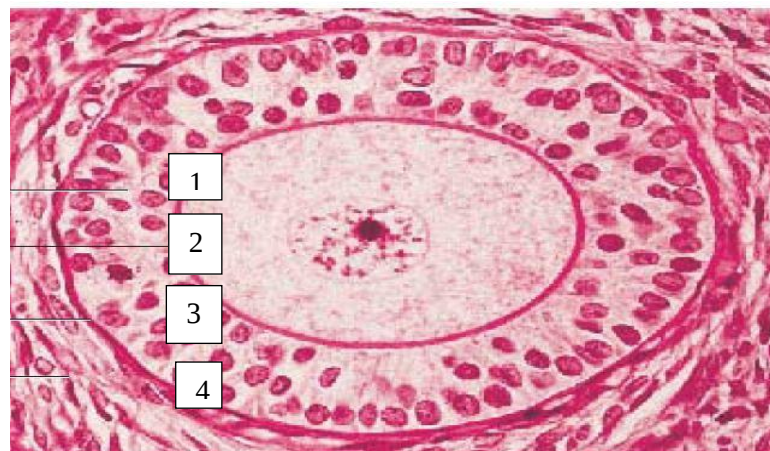
Pewarnaan: hematoxylin-eosin, perbesaran: $\times 500$

Perkembangan folikel primer juga diikuti dengan perubahan diameter oosit yang meningkat dari $\sim 25\mu\text{m}$ menjadi $\sim 120\mu\text{m}$. Faktor-faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh oosit memiliki peranan yang penting dalam mengatur folikulogenesis preantral termasuk dalam merangsang proliferasi sel granulosa dan perkembangan sel theca.

2.1.4 Folikel sekunder

Struktur folikel mulai mengalami perubahan dengan berlanjutnya folikulogenesis preantral. Perubahan yang utama selama perkembangan

folikel sekunder yaitu peningkatan jumlah sel granulosa dan penambahan sel theca. Dengan berlanjutnya perkembangan folikel sekunder, akan terbentuk dua lapisan sel theca yaitu lapisan dalam teka interna yang berdifferentiasi di dalam sel teka interstitial dan lapisan luar teka eksterna yang berdifferentiasi menjadi sel otot polos. Perkembangan teka juga diikuti dengan neoformasi dari sejumlah pembuluh-pembuluh darah kecil melalui proses angiogenesis. Darah akan bersirkulasi mengelilingi folikel, membawa nutrisi dan gonadotropin ke dalam, serta sisa dan hasil sekresi dari folikel yang sedang berkembang.



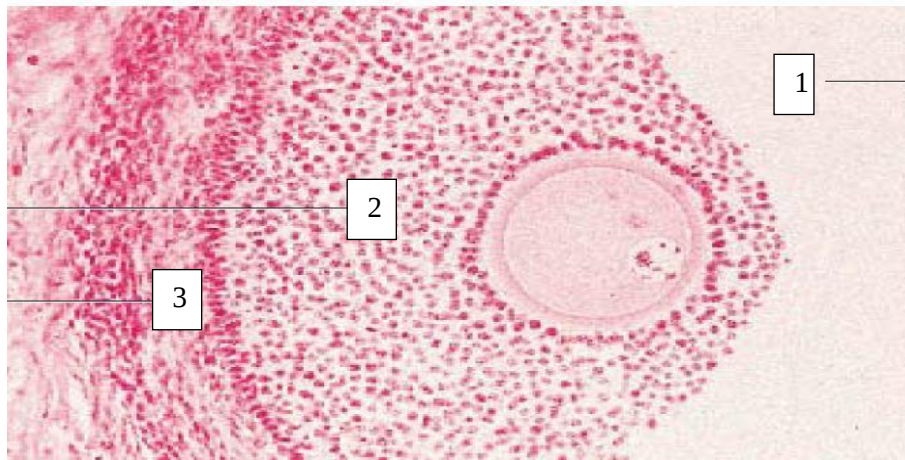
Gambar 2.4 Folikel sekunder atau folikel preantral dari ovarium wanita usia 30 tahun (55).

Keterangan : 1: folikuler epitel ; 2: Zona pelusida ; 3 membran basal ; 4 teka folliculi, Pewarnaan: hematoxylin-eosin, perbesaran: $\times 300$

Perkembangan folikel sekunder dimulai dengan bertambahnya sel granulosa lapisan kedua. Tahapan ini disebut sebagai transisi folikel primer menjadi sekunder. Hal ini diikuti dengan perubahan sel granulosa dari epitel selapis kuboid menjadi epitel berlapis kolumnar. Folikel epitel berlapis-lapis (granulosa epitel, stratum granulosum). Tebal folikel sekunder bisa menjadi mencapai $400\mu\text{m}$. Zona pelusida berada antara membran plasma oosit dan epitel granulosa seperti juga membran basal terletak antara epitel granulosa dan teka folliculi (selubung jaringan ikat stroma kortikal). Sitoplasma ovarium yang jarang granula. Inti besar berisi nucleolus menonjol.

2.1.5 Folikel graaf

Folikel graaf dapat juga disebut sebagai folikel antral atau folikel tersier. Perkembangan folikel graaf ditandai dengan munculnya suatu ruang (kavitas) atau antrum yang mengandung cairan yang disebut cairan folikuler atau *liquor folliculi*. Cairan folikuler adalah eksudat dari plasma yang merupakan hasil sekresi dari oosit dan sel granulosa. Residu sel granulosa dan oosit serta molekul-molekul regulator harus melewati cairan folikel tersebut untuk keluar dari dan melalui membran folikel (52,53).



Gambar 2.5 Folikel graaf ovarium (55).

Keterangan : 1: antrum folliculi ; 2: Cumulus oophorus dengan oosit ; 3 teka folliculi. Pewarnaan: hematoxylin-eosin, perbesaran: $\times 220$

Folikel ovarium dengan antrum yang berkembang, berlapis-lapis sel epitel granulosa, cumulus oophorus yang menjorok ke rongga folikel. Cumulus oophorus mengandung oosit. Oosit terbungkus oleh kuat zona pelusida. Seluruh folikel diselimuti oleh sel stroma, yang membentuk teka folliculi (52,53)

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi senyawa bioaktif *Nigella sativa* sebagai aktivator protein GDF9 dan ESR1 yang berperan dalam kesuburan melalui pendekatan studi *in silico*.

3.1.2 Tujuan Khusus

- a. Melakukan identifikasi dan karakterisasi protein target GDF9 dan ESR1 yang memiliki peran dalam regulasi kesuburan.
- b. Menyusun database senyawa bioaktif yang terkandung dalam *Nigella sativa* berdasarkan kajian literatur dan sumber bioinformatika.
- c. Menganalisis interaksi antara senyawa bioaktif *Nigella sativa* dengan GDF9 dan ESR1 menggunakan metode *molecular docking* untuk mengevaluasi afinitas dan mekanisme ikatan.
- d. Melakukan simulasi dinamika molekuler untuk menilai kestabilan kompleks ligand-protein dalam lingkungan biologis.
- e. Mengevaluasi potensi farmakokinetik dan toksisitas senyawa terpilih melalui prediksi ADMET guna menilai bioavailabilitas dan keamanannya.
- f. Menyusun rekomendasi kandidat senyawa bioaktif *Nigella sativa* yang berpotensi dikembangkan lebih lanjut dalam studi *in vitro* dan *in vivo* untuk aplikasi terapi kesuburan.

3.2 Manfaat Penelitian

a. Manfaat teoritis

1. Menambah wawasan dalam bidang bioinformatika dan farmakologi molekuler mengenai peran senyawa bioaktif dalam regulasi kesuburan melalui aktivasi protein GDF9 dan ESR1.
2. Memberikan dasar ilmiah bagi penelitian pengembangan obat herbal

berbasis *Nigella sativa* sebagai kandidat terapi kesuburan.

3. Menjadi referensi bagi penelitian lanjutan yang mengkaji mekanisme molekuler senyawa alami dalam meningkatkan fertilitas.

b. Manfaat praktis

1. Membantu dalam penemuan senyawa kandidat dari *Nigella sativa* yang berpotensi dikembangkan sebagai agen peningkat kesuburan.
2. Mendukung pengembangan produk herbal berbasis bukti ilmiah, yang dapat dikembangkan sebagai suplemen atau terapi komplementer untuk kesuburan.
3. Memberikan rekomendasi bagi penelitian lanjutan in vitro dan in vivo, sehingga dapat berkontribusi dalam pengembangan terapi berbasis fitokimia.
4. Mendorong pemanfaatan *Nigella sativa* sebagai sumber alami dalam penelitian medis dan farmasi, khususnya dalam bidang kesehatan reproduksi.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Ligand preparation

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada senyawa *Nigella sativa* yang didapatkan pada penelitian sebelumnya, yaitu 5-Hydroxymethylfurfural, Thymoquinone, Thymol, 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal, Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-, p-tert-Butyl catechol, Tetradecanoic acid, Tetradecanoic acid, ethyl ester, Hexadecanoic acid, methyl ester, Hexadecanoic acid, ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester, Oleic Acid, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, Eicosanoic acid, cis-13,16-Docosadienoic acid, cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester, Methyl 19-hexacosenoate, Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-, & Palmitic acid β -monoglyceride (Nivetha & Prasanna, 2016). Sedangkan untuk kontrol menggunakan terapi fertilitas clomiphene yang diketahui dapat meningkatkan kesuburan melalui peningkatan kadar gonadotropin endogen dan merangsang ovarium meningkatkan jumlah folikel (Haas & Casper, 2017). Informasi CID dan struktur 3D senyawa target dan kontrol dengan file *structure data format* (sdf) diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Software OpeBabel 2.3.1. digunakan untuk minimasi energi dan konversi file sdf menjadi *protein databank format* (pdb) (Kim et al., 2021).

4.2 Protein preparation

Growth differentiation factor-9 (GDF9) dan *Estrogen receptor 1* (ESR1) berperan sebagai target dari senyawa *Nigella sativa*. Struktur 3D dengan file *pdb* untuk kedua target diperoleh dari database Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Molekul air dan ligan kontaminan pada target dihilangkan melalui software PyMol v2.5 untuk optimalisasi dan preparasi *molecular docking* (Rigsby & Parker, 2016).

4.3 Druglikeness Identification

Sifat *drug-like molecule* pada senyawa kimia dari *Nigella sativa* diidentifikasi melalui uji druglikeness pada server SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Parameter seperti Lipinski, Ghose, Veber, Eggen, Muegge dan skor Bioavailability digunakan untuk penentuan drug-like molecule pada senyawa kandidat. Uji

druglikeness bertujuan untuk identifikasi kemiripan sifat senyawa query dengan molekul obat (Daina et al., 2017).

4.4 Molecular Docking

Simulasi interaksi ligan dari *Nigella sativa* dengan GDF9 dan ESR1 dalam penelitian ini dilakukan melalui simulasi molecular docking pada software PyRx v9.9.0. Simulasi docking bertujuan untuk identifikasi kemampuan aktivitas pengikatan ligan dan pola interaksi pada target. Aktivitas pengikatan mengacu pada nilai binding affinity pada kompleks ligan-target. Binding affinity adalah energi negatif yang terbentuk ketika ligan dan target berinteraksi membentuk kompleks molekul stabil (Tripathi et al., 2021; Wijaya et al., 2021).

4.5 Chemical Interaction

Identifikasi interaksi kimia dari kompleks ligan-protein dalam penelitian ini dilakukan melalui software LigPlot+ v.2.2. Interaksi ikatan kimia yang ditampilkan dalam software tersebut adalah hidrogen dan hidrofobik. Jenis interaksi pada kompleks ligan-protein diperankan oleh ikatan lemah untuk memicu respon biologis spesifik seperti tingkat aktivasi dan stabilitas kompleks molekul (Dibha et al., 2022).

4.6 Structural Visualization

Kompleks ligand-target ditampilkan dengan struktur 3D melalui software PyMol v2.5 dengan metode seleksi warna dan struktur. Warna ditampilkan berdasarkan ligan atomic compositions dan single protein structure. Tipe struktur yang terdiri atas cartoons, sticks, dan transparent surfaces dengan publication standard digunakan dalam penelitian ini (Rigsby & Parker, 2016).

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Hasil dan luaran yang dicapai sementara

1. Preparasi sampel ligan, Visualisasi ligand and protein target

Senyawa kimia dari *Nigella sativa* terdiri atas 5-Hydroxymethylfurfural, Thymoquinone, Thymol, 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal, Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-, p-tert-Butyl catechol, Tetradecanoic acid, Tetradecanoic acid, ethyl ester, Hexadecanoic acid, methyl ester, Hexadecanoic acid, ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester, Oleic Acid, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, Eicosanoic acid, cis-13,16-Docosadienoic acid, cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester, Methyl 19-hexacosenoate, Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-, Palmitic acid β -monoglyceride, dan Clomifene (control) dari PubChem dengan informasi yang terdiri atas CID number dan cite (Table 1), struktur 3D ligan ditampilkan sebagai sticks (Figure 1). Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi aktivitas senyawa dari *Nigella sativa* untuk aktivasi GDF9 dan ESR1. GDF9 (Uniprot ID: O60383) dengan panjang sekuens 454-mer, ESR1 (Uniprot ID: P03372) 595-mer. Struktur target ditampilkan sebagai transparent surfaces dan cartoons dengan warna tunggal (Figure 2).

Table 1. *Nigella sativa* ligand sample preparation from PubChem database

No	Compound	CID	SMILE Canonical
1.	5-Hydroxymethylfurfural	237332	<chem>C1=C(OC(=C1)C=O)CO</chem>
2.	Thymoquinone	10281	<chem>CC1=CC(=O)C(=CC1=O)C(C)C</chem>
3.	Thymol	6989	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem>
4.	2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	534886	<chem>CC(=CCC(=C(C)C)C=O)C</chem>
5.	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	6932	<chem>CC(C)(C)C1=C(C=CC(=C1)O)OC</chem>
6.	p-tert-Butyl catechol	7381	<chem>CC(C)(C)C1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
7.	Tetradecanoic acid	11005	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
8.	Tetradecanoic acid, ethyl ester	31283	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
9.	Hexadecanoic acid, methyl ester	8181	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
10.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	12366	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
11.	9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester	8203	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
12.	Oleic Acid	445639	<chem>CCCCCCCCC=CCCCCCCCC(=O)O</chem>
13.	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	3931	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)O</chem>
14.	Eicosanoic acid	10467	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
15.	cis-13,16-Docosadienoic acid	5312554	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
16.	cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	6430995	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
17.	Methyl 19-hexacosenoate	91692796	<chem>CCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
18.	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-	22213932	<chem>CC(C)CCCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CCC4C3(CC(=C)C(C4)O)C)C</chem>
19.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	21159744	<chem>CCC=CCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)OC(COC(=O)C)COC(=O)C</chem>
20.	Palmitic acid β - monoglyceride	123409	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC(CO)CO</chem>
21.	Clomifene (Control)	2800	<chem>CCN(CC)CCOC1=CC=C(C=C1)C(=C(C2=CC=CC=C2)Cl)C3=CC=CC=C3</chem>

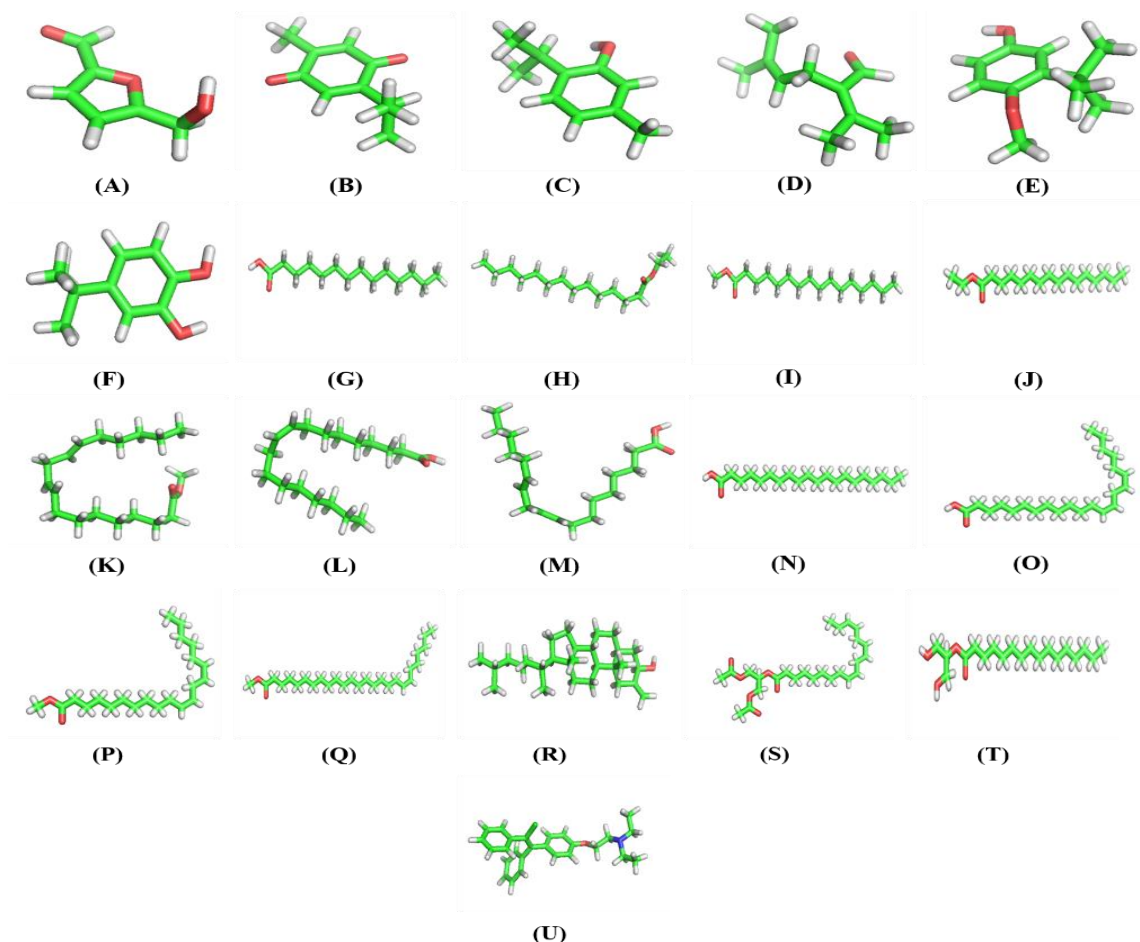


Figure 1. Ligand structural visualization. (A) 5-Hydroxymethylfurfural, (B) Thymoquinone, (C) Thymol, (D) 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal, (E) Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-, (F) p-tert-Butyl catechol, (G) Tetradecanoic acid, (H) Tetradecanoic acid, ethyl ester, (I) Hexadecanoic acid, methyl ester, (J) Hexadecanoic acid, ethyl ester, (K) 9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester, (L) Oleic Acid, (M) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, (N) Eicosanoic acid, (O) cis-13,16-Docosadienoic acid, (P) cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester, (Q) Methyl 19-hexacosenoate, (R) Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-, (S) 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-, (T) Palmitic acid β -monoglyceride, (U) Clomifene (Control).

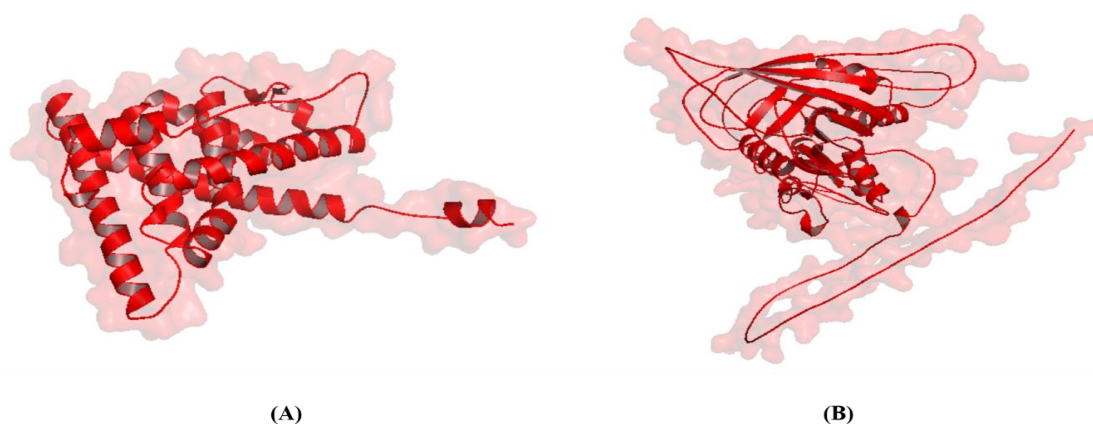


Figure 2. Protein structural visualization (A) ESR1 (Uniprot ID: P03372) (B) GDF9 (Uniprot ID: O60383)

Drug-likeness

Hasil identifikasi druglikenes menunjukkan bahwa seluruh senyawa dari *Nigella sativa* dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut potensinya sebagai aktivasi fertilitas (Tabel 2).

Table 2. The result of druglikeness analysis

No	Compound	Lipinski	Ghose	Veber	Eggan	Bioavailability Score
1.	5-Hydroxymethylfurfural	Yes	No	Yes	Yes	0.55
2.	Thymoquinone	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
3.	Thymol	Yes	No	Yes	Yes	0.55
4.	2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	Yes	No	Yes	Yes	0.55
5.	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
6.	p-tert-Butyl catechol	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
7.	Tetradecanoic acid	Yes	Yes	No	Yes	0.85
8.	Tetradecanoic acid, ethyl ester	Yes	Yes	No	Yes	0.55
9.	Hexadecanoic acid, methyl ester	Yes	No	No	Yes	0.55
10.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	Yes	No	No	No	0.55
11.	9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester	Yes	No	No	No	0.55
12.	Oleic Acid	Yes	No	No	No	0.85
13.	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	Yes	No	No	No	0.85
14.	Eicosanoic acid	Yes	No	No	No	0.85

15.	cis-13,16-Docasadienoic acid	Yes	No	No	No	0.85
16	cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	Yes	No	No	No	0.55
17.	Methyl 19-hexacosenoate	Yes	No	No	No	0.55
18.	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-	Yes	No	Yes	No	0.55
19.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	Yes	No	No	Yes	0.55
20.	Palmitic acid β - monoglyceride	Yes	Yes	No	Yes	0.55
21.	Clomifene (Control)	Yes	No	Yes	No	0.55

Docking Molekul

Molecular docking dalam penelitian ini bertujuan untuk identifikasi pola interaksi molekul dan penilaian tingkat aktivitas ikatan antar senyawa dari *Nigella sativa* pada protein target yaitu GDF9 dan ESR1. Hasil docking menunjukkan bahwa senyawa dari *Nigella sativa* yang terdiri atas cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)- memiliki binding affinity lebih negatif dibanding senyawa lainnya dan control yaitu clomifene (Table 3). Kompleks ligan-protein dari hasil simulasi docking dengan binding affinity paling negatif ditampilkan dengan struktur stick, transparent surfaces, dan cartoons dengan pewarnaan tunggal (Figure 3).

Table 3. The docking result of *Nigella sativa* compound-target

No	Compound	CID	Binding Affinity (kcal/mol)	
			ESR1	GDF9
1.	5-Hydroxymethylfurfural	237332	-6.4	-5.3
2.	Thymoquinone	10281	-6.2	-6.3
3.	Thymol	6989	-6.1	-5.9
4.	2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	534886	-5.9	-5.3
5.	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	6932	-6.2	-5.2
6.	p-tert-Butyl catechol	7381	-6.4	-5.7
7.	Tetradecanoic acid	11005	-5.8	-5.2
8.	Tetradecanoic acid, ethyl ester	31283	-6.1	-4.7
9.	Hexadecanoic acid, methyl ester	8181	-6.1	-4.5
10.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	12366	-6.1	-5.3
11.	9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester	8203	-4.9	-5.2
12.	Oleic Acid	445639	-4.7	-5.2
13.	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	3931	-6.4	-5.0
14.	Eicosanoic acid	10467	-6.4	-5.0
15.	cis-13,16-Docosadienoic acid	5312554	<u>-7.6</u>	<u>-7.3</u>
16.	cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	6430995	-6.3	-4.2
17.	Methyl 19-hexacosenoate	91692796	-6.5	-4.1
18.	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-	22213932	<u>-7.1</u>	<u>-8.0</u>
19.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	21159744	-6.7	-5.4
20.	Palmitic acid β -monoglyceride	123409	-4.6	-5.4
21.	Clomifene (Control)	2800	<u>-6.8</u>	<u>-6.4</u>

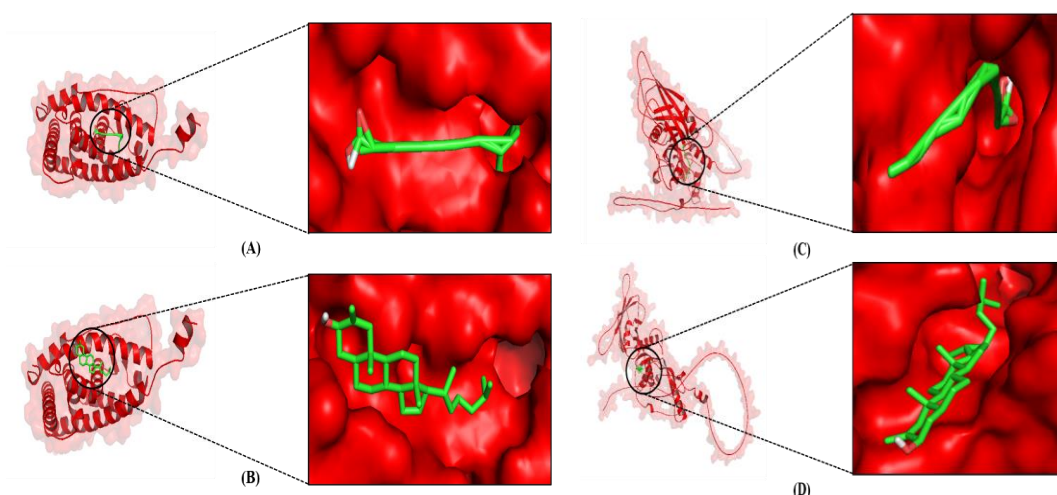


Figure 3. Targets-ligand structural visualization from the docking

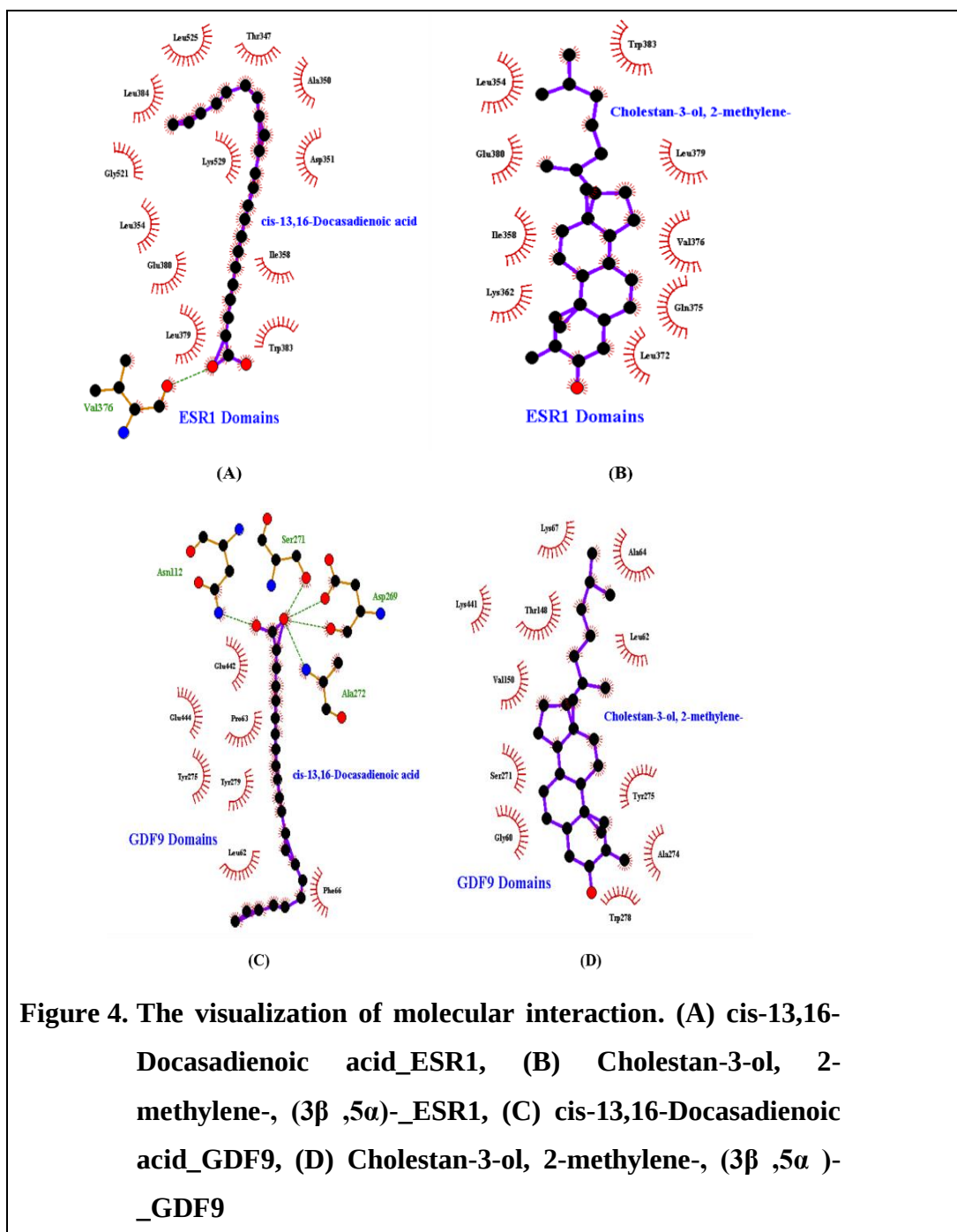
simulation. (A) cis-13,16-Docasadienoic acid_ESR1, (B) Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_ESR1, (C) cis-13,16-Docasadienoic acid_GDF9, (D) Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_GDF9

Interaksi molekuler antara protein target dan ligan

Pada hasil analisis interaksi molekuler menunjukkan cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)- dapat membentuk interaksi ikatan lemah yang terdiri atas hidrogen dan hidrofobik (Figure 4). Kedua senyawa tersebut memiliki kesamaan posisi interaksi melalui Leu354, Glu380, Leu379, Trp383, Ile358, Val376 pada domain ESR1 dan GDF9 melalui Tyr275, Leu62, Ser271, posisi warna kuning adalah domain ESR1 dan warna biru adalah domain GDF9 (Table 4).

Table 3. The results of chemical interaction analysis

Ligan-protein	Chemical Interaction
cis-13,16-Docasadienoic acid_ESR1	Hydrophobic: Leu525, Thr347, Ala350, Leu384, Gly521, <u>Leu354</u> , <u>Glu380</u> , <u>Leu379</u> , <u>Trp383</u> , <u>Ile358</u> , Lys529, Asp351 Hydrogen: <u>Val376</u>
Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_ESR1	Hydrophobic: <u>Leu354</u> , <u>Glu380</u> , <u>Ile358</u> , Lys362, Leu372, Gln375, <u>Val376</u> , <u>Leu379</u> , <u>Trp383</u>
cis-13,16-Docasadienoic acid_GDF9	Hydrophobic: Glu442, Pro63, Tyr279, Glu444, <u>Tyr275</u> , <u>Leu62</u> , Phe66 Hydrogen: Asn112, <u>Ser271</u> , Asp269, Ala272
Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_GDF9	Hydrophobic: Lys67, Thr148, Lys441, Val150, <u>Ser271</u> , Gly60, Trp278, Ala274, <u>Tyr275</u> , <u>Leu62</u> , Ala64



BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana kedepan adalah melakukan tabulasi data, pengolahan data, analisis data dan pembuatan laporan hasil serta penulisan artikel dan publikasi ilmiah.

Tabel 6.1 rencana tahapan

No	Uraian Kegiatan	Bulan								
		4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Pengolahan dan analisa data						√	√		
2	Monitoring dan evaluasi laporan kemajuan								√	
3	Publikasi Luaran									√
4	Laporan akhir									√

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

8.1 Kesimpulan

Dari hasil sementara penelitian yang sudah dilakukan secara garis besar dapat disimpulkan bahwa Protein GDF9 dan ESR1 memiliki peran penting dalam regulasi kesuburan, di mana aktivasi kedua protein ini berkontribusi terhadap peningkatan kualitas dan pematangan oosit serta regulasi hormonal dalam sistem reproduksi. Beberapa senyawa bioaktif dalam *Nigella sativa* menunjukkan potensi sebagai aktivator GDF9 dan ESR1 berdasarkan analisis molecular docking, dengan interaksi yang kuat terhadap situs aktif protein target. Prediksi ADMET menunjukkan bahwa beberapa senyawa bioaktif memiliki bioavailabilitas yang baik dan toksisitas yang rendah, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat agen peningkat kesuburan berbasis fitokimia. Secara keseluruhan, penelitian ini berhasil mengidentifikasi senyawa bioaktif dari *Nigella sativa* yang memiliki potensi sebagai aktivator protein GDF9 dan ESR1, yang dapat menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut dalam pengembangan terapi kesuburan berbasis herbal.

8.2 Saran

Validasi Eksperimental diperlukan penelitian in vitro dan in vivo untuk mengonfirmasi efektivitas senyawa bioaktif yang telah diidentifikasi dalam studi in silico, guna memahami mekanisme kerja secara biologis pada sistem reproduksi. Perlu adanya optimasi formulasi, jika hasil in vitro dan in vivo menunjukkan efektivitas yang baik, maka formulasi produk berbasis *Nigella sativa* perlu dikembangkan untuk memastikan efektivitas dan keamanan dalam aplikasi klinis. Selain itu, eksplorasi kombinasi senyawa pada penelitian lebih lanjut dapat mengkaji kombinasi senyawa bioaktif dengan terapi kesuburan konvensional untuk melihat efek sinergis yang mungkin meningkatkan efektivitas pengobatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, N. S., Kharisma, V. D., Widyananda, M. H., Murtadlo, A. A. A., Probojati, R. T., Turista, D. D. R., Tamam, M. B., Jakhmola, V., Novaliendry, D., Mandeli, R. S., Oktavia, B., Albari, M. T., Al Aziz, S., Ghifari, M. R., Suryani, O., Azhari, P., Ghifari, M. A., Purnamasari, D., Samala, A. D., ... Zainul, R. (2022). Bioactive Compounds from Purslane (*Portulaca oleracea* L.) and Star Anise (*Illicium verum* Hook) as SARS-CoV-2 Antiviral Agent via Dual Inhibitor Mechanism: In Silico Approach. *Pharmacognosy Journal*, 14(4), 352–357. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.106>
- Alam, M. H., Lee, J., & Miyano, T. (2018). GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 423–431. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-078>
- Arnal, J. F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., & Katzenellenbogen, J. (2017). Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: From tissue specificity to medical implications. *Physiological Reviews*, 97(3), 1045–1087. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Datta, J., Palmer, M. J., Tanton, C., Gibson, L. J., Jones, K. G., Macdowall, W., Glasier, A., Sonnenberg, P., Field, N., Mercer, C. H., Johnson, A. M., & Wellings, K. (2016). Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction*, 31(9), 2108–2118. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew123>
- Dibha, A. F., Wahyuningsih, S., Ansori, A. N. M., Kharisma, V. D., Widyananda, M. H., Parikesit, A. A., Sibero, M. T., Probojati, R. T., Murtadlo, A. A. A., Trinugroho, J. P., Sucipto, T. H., Turista, D. D. R., Rosadi, I., Ullah, M. E., Jakhmola, V., & Zainul, R. (2022). Utilization of Secondary Metabolites in Algae *Kappaphycus alvarezii* as a Breast Cancer Drug with a Computational Method. *Pharmacognosy Journal*, 14(3), 536–543. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.68>
- Durán-Pastén, M. L., & Fiordelisio, T. (2013a). GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Frontiers in Endocrinology*, 4(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00127>
- Durán-Pastén, M. L., & Fiordelisio, T. (2013b). GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Frontiers in Endocrinology*, 4(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00127>
- Emori, C., & Sugiura, K. (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal*, 85(6), 627–633. <https://doi.org/10.1111/asj.12200>

- Fritz, M. A. dan L. S. (2011). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* (8 th Editi). Lippincott Williams & Wilkin.
- Haas, J., & Casper, R. F. (2017). In vitro fertilization treatments with the use of clomiphene citrate or letrozole. *Fertility and Sterility*, 108(4), 568–571. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.08.017>
- Halimah, A. N., & Winarni, S. (2018). Reproduksi Organ Pada Wanita Dengan Masalah Fertilitas di RSI Sultan Agung. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 6(4).
- Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 125). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>
- Hannan, M Abdul; Rahman, M Ataur; Sohag, Abdullah Al Mamun; Uddin, Jamal; Dash, Raju ; Sikder, Mahmudul Hasan; Rahman, Saidur; Munni, Yeasmin Akter; Timalsina, B. ;, & Mohibbullah; Sarker, P. P. et all. (2021). Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*, 13(1784), 1–60.
- Karim Rumi, M. A., Singh, P., Roby, K. F., Zhao, X., Iqbal, K., Ratri, A., Lei, T., Cui, W., Borosha, S., Dhakal, P., Kubota, K., Chakraborty, D., Vivian, J. L., Wolfe, M. W., & Soares, M. J. (2017). Defining the role of estrogen receptor b in the regulation of female fertility. *Endocrinology*, 158(7), 2330–2343. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1916>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). *PubChem in 2021 : new data content and improved web interfaces*. 49(November 2020), 1388–1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Lins, L., & Brasseur, R. (1995). The hydrophobic effect in protein folding. *The FASEB Journal*, 9(7), 535–540. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737462>
- Martin, Y. C. (2005). A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(9), 3164–3170. <https://doi.org/10.1021/jm0492002>
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178–2180. <https://doi.org/10.1126/science.1071965>
- Nivetha, K., & Prasanna, G. (2016). *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences GC-MS and FT-IR Analysis of Nigella sativa L . Seeds*. 3(6), 45–54.
- Patel, S., Zhou, C., Rattan, S., & Flaws, J. A. (2015). Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary1. *Biology of Reproduction*, 93(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130336>
- Patrick, G. L. (2013). An Introduction to Medical Chemistry. In *Oxford University Press* (Fifth Edit). Oxford University Press.
- Rigsby, R. E., & Parker, A. B. (2016). Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5), 433–437. <https://doi.org/10.1002/bmb.20966>
- Sahak, M. K. A., Kabir, N., Abbas, G., Draman, S., Hashim, N. H., & Hasan Adli, D. S. (2016). The role of *Nigella sativa* and its active constituents in learning and memory. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6075679>
- Soyal, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, 127(21), 4645–

4654. <https://doi.org/10.1242/dev.127.21.4645>
- Tripathi, D., Koora, S., Satyanarayana, K., Saleem, B. S., & Jayaraman, S. (2021). Molecular docking analysis of COX-2 with compounds from *Piper longum*. *Bioinformation*, 17(6), 623–627. <https://doi.org/doi:10.6026/97320630017623>
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., Emori, C., Sugiura, K., & Eppig, J. J. (2015). Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 92(1), 1–14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121756>
- Wijaya, R. M., Hafidzhah, M. A., Wijaya, R. M., Hafidzhah, M. A., & Kharisma, V. D. (2021). COVID-19 In Silico Drug with *Zingiber officinale* Natural Product Compound Library Targeting the Mpro Protein COVID-19 In Silico Drug with *Zingiber officinale* Natural Product Compound Library Targeting the Mpro Protein. 25(3). <https://doi.org/10.7454/mss.v25i3.1244>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>

Lampiran 1. Luaran Naskah Publikasi

Analisis In Silico Potensi Fertilitas Dari Senyawa Bioaktif Nigella Sativa Analisis In Silico Senyawa Bioaktif Nigella sativa sebagai potensi fertilitas pada gangguan folikulogenesis

Amirul Amalia^{1,4}, Hendy Hendarto^{2*}, Arifa Mustika³

¹ Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia

² Department of Obstetric Gynecology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia

³ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia

⁴ Faculty of Health Science, Universitas Muhammadiyah Lamongan, Indonesia

*Email address: hendy.hendarto@fk.unair.ac.id

*Corresponding author address:

Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo, 60132, Surabaya, Indonesia

Tel: +628123007080

The institutional e-mail of the ALL authors must be declared (and add rows according to the number of authors):

Author	Institutional e-mail (mandatory)	Other e-mail (gmail, yahoo, etc.)
Amirul Amalia	amirul.amalia-2019@fk.unair.ac.id	amirul2383@gmail.com
Hendy Hendarto	hendy.hendarto@fk.unair.ac.id	
Arifa Mustika	arifa-m@fk.unair.ac.id	

Contribution Details (to be ticked marked (X) as applicable and add columns

according to the number of authors):

Contribution	Amirul Amalia	Hendy Hendarto	Arifa Mustika
Concepts or Ideas	X	X	X
Design	X	X	
Definition of intellectual content	X	X	X
Literature search	X		
Experimental studies	X	X	X
Data acquisition	X		X
Data analysis	X	X	X
Statistical analysis	X		X
Manuscript preparation	X		
Manuscript editing	X		X
Manuscript review	X	X	X

Lampiran 2 . Artikel Ilmiah

ABSTRACT

Context: Kesuburan merupakan kemampuan untuk menjadi hamil. Hingga saat ini masih banyak ditemukan kejadian ketidaksuburan. Hal ini disebabkan gangguan folikulogenesis. Rendahnya GDF9 dan ESR1 dapat digunakan sebagai biomarker pada gangguan folikulogenesis. *Nigella sativa* merupakan tanaman yang memiliki khasiat obat sebagai penawar racun, melindungi toksisitas pada paru-paru, jantung, hati, saluran pencernaan dan sistem reproduksi.

Objective: Untuk mengidentifikasi potensi senyawa bioaktif *Nigella sativa* sebagai aktivator protein GDF9 dan ESR1 pada kesuburan dalam pendekatan studi insilico.

Metode : semua ligan dari ekstrak *Nigella sativa* dari penelitian sebelumnya, dan preparat protein masing-masing diambil dari database bank data Pubchem. Konversi file *sdf* menjadi *pdb* pada ligan dilakukan melalui software OpenBabel v2.3.1. Sifat *drug-like molecule* pada senyawa kimia dari *Nigella sativa* diidentifikasi melalui uji druglikeness pada server SwissADME dan menggunakan software PyRx v9.9.0, software LigPlot+ v.2.2, serta software PyMol v2.5 untuk menganalisis dan memvisualisasikan potensi senyawa *Nigella sativa* terhadap protein GDF9 dan ESR1.

Hasil: Senyawa cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3β , 5α)- memiliki ikatan afinitas terendah, interaksi hydrogen dan hydrophobic, serta kesamaan posisi interaksi asam amino untuk mengontrol.

Kesimpulan: cis-13,16-Docasadienoic acid & Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3β , 5α)- dapat berperan sebagai kandidat aktivator protein ESR1 dan GDF9 untuk kesuburan.

Keywords: ESR1, GDF9, *Nigella sativa*, kesuburan, molecular docking.

INTRODUCTION

Fertilitas adalah kapasitas untuk membentuk kehamilan (Zegers-Hochschild et al., 2017). Setiap pasangan pasti mempunyai keinginan untuk hamil dan memiliki keturunan. Namun pada kenyataannya masih banyak ditemukan pasangan yang tidak dapat hamil setelah menikah. Kegagalan untuk mencapai kehamilan setelah 12 bulan atau lebih hubungan seksual tanpa alat kontrasepsi secara teratur disebut infertilitas (Datta et al., 2016). Infertil pada pasangan usia subur di seluruh dunia diperkirakan sekitar 50-80 juta. Di Indonesia, 10 -15% jumlah penduduk mengalami infertilitas. Prevalensi wanita usia subur yang mengalami infertilitas diperkirakan mencapai 6.08% dan tertinggi terdapat pada usia 20-24 tahun sebanyak 21,3% (Halimah & Winarni, 2018). Infertilitas merupakan masalah kesehatan masyarakat karena mempengaruhi jutaan wanita di seluruh dunia. Salah satu penyebab infertilitas adalah gangguan folikulogenesis. (Patel et al., 2015).

Ovarium berisi folikel primordial yang sangat banyak. Beberapa dari folikel ini memasuki fase pertumbuhan dan berkembang melalui tahap folikel primer dan sekunder. Sel granulosa folikel berkembang biak untuk mengembangkan struktur berlapis-lapis selama perkembangan folikel. Kemudian, terbentuk rongga berisi cairan di dalam folikel pada saat tahap folikel antral. Rongga berisi cairan ini disebut antrum. Pada folikel antral, sel granulosa berpisah membentuk sel kumulus granulosa yang membungkus oosit, dan sel granulosa mural yang membentuk lapisan dalam dinding folikel (Wigglesworth et al., 2015). Komunikasi

dua arah antara oosit dan sel granulosa diperlukan untuk fungsi ovarium dan kesuburan (Alam et al., 2018). Sel granulosa memasok nutrisi, metabolit, dan sinyal molekuler ke oosit, sementara oosit meningkatkan proliferasi, diferensiasi, dan fungsi sel granulosa. Oosit memainkan peran penting dalam regulasi perkembangan folikel (Matzuk et al., 2002). Oosit diperlukan untuk pembentukan folikel primordial awal dan mengatur karakteristik dan fungsi spesifik antara sel kumulus granulosa dan sel granulosa mural. Selama pematangan, oosit mengeluarkan faktor yang menginduksi ekspansi kumulus yaitu GDF-9 (Soyal et al., 2000).

GDF-9 adalah faktor penting yang diturunkan dari oosit yang mengatur fungsi ovarium (Emori & Sugiura, 2014). GDF-9 memiliki efek bervariasi pada sel teka dan sel granulosa. GDF-9 diketahui menstimulasi diferensiasi sel granulosa, termasuk menginduksi reseptor LH dan steroidogenesis (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013a)(Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013b). Hasil penelitian Fritz, menyatakan tikus yang mengalami defisiensi GDF-9 ditemukan infertile karena perkembangan folikuler tidak dapat berjalan melebihi tahap folikel primordial (Fritz, 2011). Selain GDF-9, ada protein yang penting dalam proses folikulogenesis yaitu ESR 1. ESR 1 memainkan peran kunci dalam reproduksi dengan berfungsi sebagai mediator hormone estrogen. Hasil penelitian terdahulu mengatakan adanya gangguan ESR 1 dapat menyebabkan infertilitas (Arnal et al., 2017; Karim Rumi et al., 2017)

Nigella sativa diakui sebagai tanaman ajaib, kaum muslim menyebut tanaman ini sebagai *Habbatus Sauda*, *Alhabahat Isawda* dan *Alkamoun Alaswad* (Sahak et al., 2016). *Nigella sativa* juga diketahui memiliki khasiat obat sebagai penawar racun, melindungi terhadap toksisitas pada beberapa organ, termasuk otak, ginjal, paru-paru, hati, jantung, saluran pencernaan dan system reproduksi (Hannan, M Abdul; Rahman, M Ataur; Sohag, Abdullah Al Mamun; Uddin, Jamal; Dash, Raju ; Sikder, Mahmudul Hasan; Rahman, Saidur; Munni, Yeasmin Akter; Timalisina & Mohibbullah; Sarker, 2021). Sejauh ini, penelitian tentang *Nigella sativa* sebagai potensi fertilitas yang mengaktifasi GDF-9 dan ESR 1 masih belum ada. Jadi, penelitian ini bertujuan untuk memprediksi potensi fertilitas dari senyawa bioaktif *Nigella sativa* dengan meningkatkan aktivitas GDF-9 dan ESR 1.

MATERIAL AND METHODS

Ligand preparation

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada senyawa *Nigella sativa* yang didapatkan pada penelitian sebelumnya, yaitu 5-Hydroxymethylfurfural, Thymoquinone, Thymol, 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal, Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-, p-tert-Butyl catechol, Tetradecanoic acid, Tetradecanoic acid, ethyl ester, Hexadecanoic acid, methyl ester, Hexadecanoic acid, ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester, Oleic Acid, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, Eicosanoic acid, cis-13,16-Docosadienoic acid , cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester, Methyl 19-

hexacosenoate, Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-, & Palmitic acid β -monoglyceride (Nivetha & Prasanna, 2016). Sedangkan untuk kontrol menggunakan terapi fertilitas clomiphene yang diketahui dapat meningkatkan kesuburan melalui peningkatan kadar gonadotropin endogen dan merangsang ovarium meningkatkan jumlah folikel (Haas & Casper, 2017). Informasi CID dan struktur 3D senyawa target dan kontrol dengan file *structure data format* (sdf) diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Software OpeBabel 2.3.1. digunakan untuk minimasi energi dan konversi file sdf menjadi *protein databank format* (pdb) (Kim et al., 2021).

Protein preparation

Growth differentiation factor-9 (GDF9) dan *Estrogen receptor 1* (ESR1) berperan sebagai target dari senyawa *Nigella sativa*. Struktur 3D dengan file *pdb* untuk kedua target diperoleh dari database Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Molekul air dan ligan kontaminan pada target dihilangkan melalui software PyMol v2.5 untuk optimalisasi dan preparasi *molecular docking* (Rigsby & Parker, 2016).

Druglikeness Identification

Sifat *drug-like molecule* pada senyawa kimia dari *Nigella sativa* diidentifikasi melalui uji druglikeness pada server SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Parameter seperti Lipinski, Ghose, Veber, Eggen, Muegge dan skor Bioavailability digunakan untuk penentuan drug-like molecule pada senyawa kandidat. Uji druglikeness bertujuan untuk identifikasi kemiripan sifat senyawa query dengan molekul obat (Daina et al., 2017).

Molecular Docking

Simulasi interaksi ligan dari *Nigella sativa* dengan GDF9 dan ESR1 dalam penelitian ini dilakukan melalui simulasi molecular docking pada software PyRx v9.9.0. Simulasi docking bertujuan untuk identifikasi kemampuan aktivitas pengikatan ligan dan pola interaksi pada target. Aktivitas pengikatan mengacu pada nilai binding affinity pada kompleks ligan-target. Binding affinity adalah energi negatif yang terbentuk ketika ligan dan target berinteraksi membentuk kompleks molekul stabil (Tripathi et al., 2021; Wijaya et al., 2021).

Chemical Interaction

Identifikasi interaksi kimia dari kompleks ligan-protein dalam penelitian ini dilakukan melalui software LigPlot+ v.2.2. Interaksi ikatan kimia yang ditampilkan dalam software tersebut adalah hidrogen dan hidrofobik. Jenis interaksi pada kompleks ligan-protein diperankan oleh ikatan lemah untuk memicu respon biologis spesifik seperti tingkat aktivasi dan stabilitas kompleks molekul (Dibha et al., 2022).

Structural Visualization

Kompleks ligand-target ditampilkan dengan struktur 3D melalui software PyMol v2.5 dengan metode seleksi warna dan struktur. Warna ditampilkan berdasarkan ligan atomic compositions dan single protein structure. Tipe struktur yang terdiri atas cartoons, sticks, dan transparent surfaces dengan *publication standard* digunakan dalam penelitian ini (Rigsby & Parker, 2016).

RESULTS

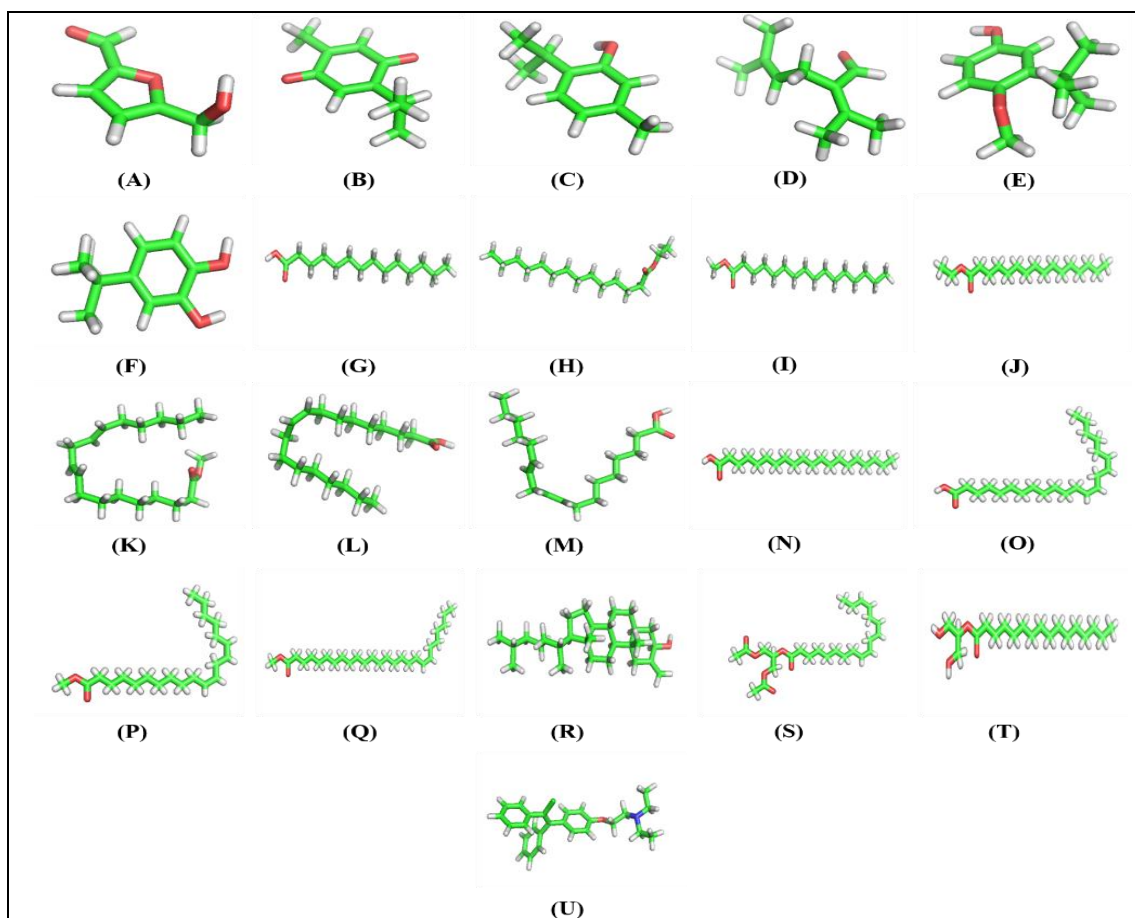
Preparasi sampel ligan, Visualisasi ligand and protein target

Senyawa kimia dari *Nigella sativa* terdiri atas 5-Hydroxymethylfurfural, Thymoquinone, Thymol, 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal, Phenol, 3-(1,1-

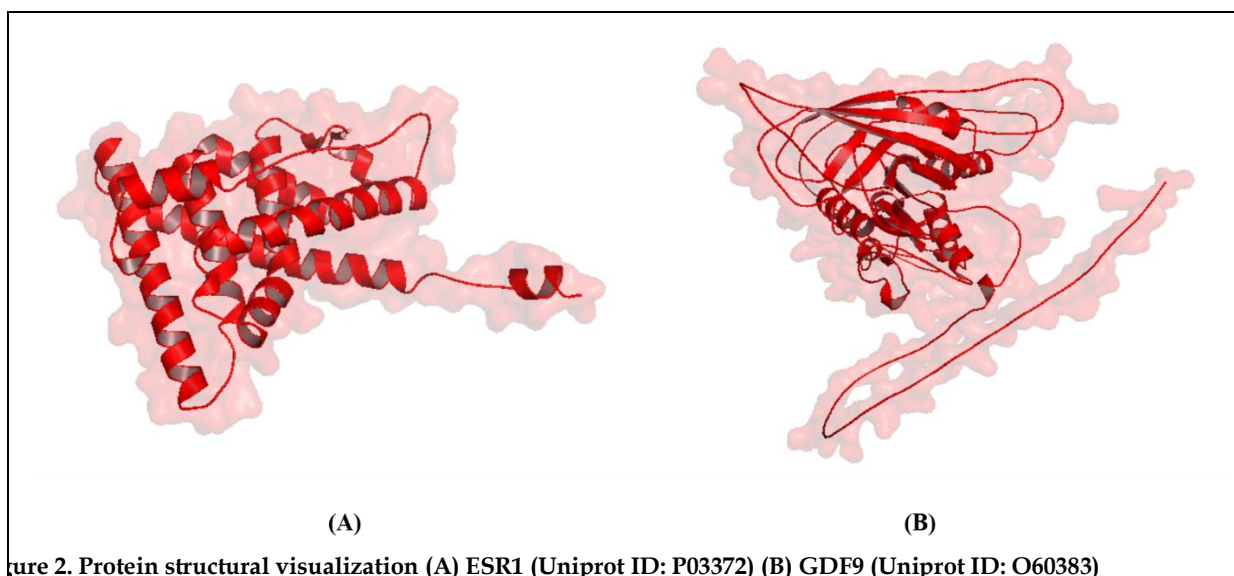
dimethylethyl)-4-methoxy-, p-tert-Butyl catechol, Tetradecanoic acid, Tetradecanoic acid, ethyl ester, Hexadecanoic acid, methyl ester, Hexadecanoic acid, ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester, Oleic Acid, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, Eicosanoic acid, cis-13,16-Docosadienoic acid, cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester, Methyl 19-hexacosenoate, Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-, Palmitic acid β -monoglyceride, dan Clomifene (control) dari PubChem dengan informasi yang terdiri atas CID number dan cite (Table 1), struktur 3D ligan ditampilkan sebagai sticks (Figure 1). Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi aktivitas senyawa dari *Nigella sativa* untuk aktivasi GDF9 dan ESR1. GDF9 (Uniprot ID: O60383) dengan panjang sekuens 454-mer, ESR1 (Uniprot ID: P03372) 595-mer. Struktur target ditampilkan sebagai transparent surfaces dan cartoons dengan warna tunggal (Figure 2).

Table 1. *Nigella sativa* ligand sample preparation from PubChem database

N o	Compound	CID	SMILE Canonical
1.	5-Hydroxymethylfurfural	23733 2	<chem>C1=C(OC(=C1)C=O)CO</chem>
2.	Thymoquinone	10281	<chem>CC1=CC(=O)C(=CC1=O)C(C)C</chem>
3.	Thymol	6989	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem>
4.	2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	53488 6	<chem>CC(=CCC(=C(C)C)C=O)C</chem>
5.	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	6932	<chem>CC(C)(C)C1=C(C=CC(=C1)O)OC</chem>
6.	p-tert-Butyl catechol	7381	<chem>CC(C)(C)C1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
7.	Tetradecanoic acid	11005	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
8.	Tetradecanoic acid, ethyl ester	31283	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
9.	Hexadecanoic acid, methyl ester	8181	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
10.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	12366	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
11.	9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester	8203	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
12.	Oleic Acid	44563 9	<chem>CCCCCCCCC=CCCCCCCCC(=O)O</chem>
13.	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	3931	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)O</chem>
14.	Eicosanoic acid	10467	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
15.	cis-13,16-Docosadienoic acid	53125 54	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
16.	cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	64309 95	<chem>CCCCC=CCC=CCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
17.	Methyl 19-hexacosenoate	91692 796	<chem>CCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
18.	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3β,5α)-	22213 932	<chem>CC(C)CCCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CCC4C3(CC(=C)C(C4)O)C)C</chem>
19.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	21159 744	<chem>CCC=CCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)OC(COC(=O)C)COC(=O)C</chem>
20.	Palmitic acid β - monoglyceride	12340 9	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC(CO)CO</chem>
21.	Clomifene (Control)	2800 34	<chem>CCN(CC)CCOC1=CC=C(C=C1)C(=C(C2=CC=CC=C2)Cl)C3=CC=CC=C3</chem>



. Ligand structural visualization. (A) 5-Hydroxymethylfurfural, (B) Thymoquinone, (C) Thymol, (D) 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal, (E) Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-, (F) p-tert-Butyl catechol, (G) Tetradecanoic acid, (H) Tetradecanoic acid, ethyl ester, (I) Hexadecanoic acid, methyl ester, (J) Hexadecanoic acid, ethyl ester, (K) 9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester, (L) Oleic Acid, (M) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, (N) Eicosanoic acid, (O) cis-13,16-Docosadienoic acid, (P) cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester, (Q) Methyl 19-hexacosenoate, (R) Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-, (S) 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-, (T) Palmitic acid β -monoglyceride, (U) Clomifene (Control).



Drug-likeness

Hasil identifikasi druglikenes menunjukkan bahwa seluruh senyawa dari *Nigella sativa* dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut potensinya sebagai aktivasi fertilitas (Tabel 2).

Table 2. The result of druglikeness analysis

No	Compound	Lipinski	Ghose	Veber	Eggan	Bioavailability Score
1.	5-Hydroxymethylfurfural	Yes	No	Yes	Yes	0.55
2.	Thymoquinone	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
3.	Thymol	Yes	No	Yes	Yes	0.55
4.	2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	Yes	No	Yes	Yes	0.55
5.	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
6.	p-tert-Butyl catechol	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
7.	Tetradecanoic acid	Yes	Yes	No	Yes	0.85
8.	Tetradecanoic acid, ethyl ester	Yes	Yes	No	Yes	0.55
9.	Hexadecanoic acid, methyl ester	Yes	No	No	Yes	0.55
10.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	Yes	No	No	No	0.55
11.	9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester	Yes	No	No	No	0.55
12.	Oleic Acid	Yes	No	No	No	0.85
1	9,12-Octadecadienoic	Yes	No	No	No	0.85

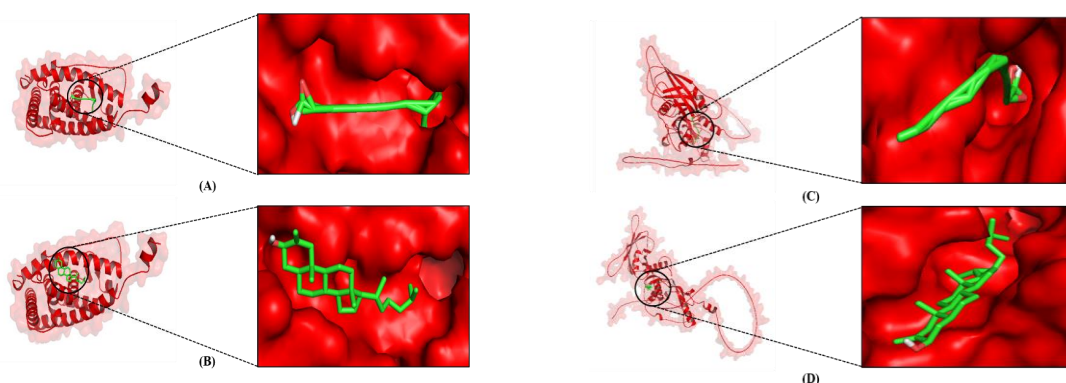
3.	acid (Z,Z)-					
1 4.	Eicosanoic acid	Yes	No	No	No	0.85
1 5.	cis-13,16-Docasadienoic acid	Yes	No	No	No	0.85
1 6.	cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	Yes	No	No	No	0.55
1 7.	Methyl 19-hexacosenoate	Yes	No	No	No	0.55
1 8.	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-	Yes	No	Yes	No	0.55
1 9.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	Yes	No	No	Yes	0.55
2 0.	Palmitic acid β - monoglyceride	Yes	Yes	No	Yes	0.55
2 1.	Clomifene (Control)	Yes	No	Yes	No	0.55

Docking Molekul

Molecular docking dalam penelitian ini bertujuan untuk identifikasi pola interaksi molekul dan penilaian tingkat aktivitas ikatan antar senyawa dari *Nigella sativa* pada protein target yaitu GDF9 dan ESR1. Hasil docking menunjukkan bahwa senyawa dari *Nigella sativa* yang terdiri atas cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)- memiliki binding affinity lebih negatif dibanding senyawa lainnya dan control yaitu clomifene (Table 3). Kompleks ligan-protein dari hasil simulasi docking dengan binding affinity paling negatif ditampilkan dengan struktur stick, transparent surfaces, dan cartoons dengan pewarnaan tunggal (Figure 3).

Table 3. The docking result of *Nigella sativa* compound-target

No	Compound	CID	Binding Affinity (kcal/mol)	
			ESR1	GDF9
1.	5-Hydroxymethylfurfural	237332	-6.4	-5.3
2.	Thymoquinone	10281	-6.2	-6.3
3.	Thymol	6989	-6.1	-5.9
4.	2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	534886	-5.9	-5.3
5.	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	6932	-6.2	-5.2
6.	p-tert-Butyl catechol	7381	-6.4	-5.7
7.	Tetradecanoic acid	11005	-5.8	-5.2
8.	Tetradecanoic acid, ethyl ester	31283	-6.1	-4.7
9.	Hexadecanoic acid, methyl ester	8181	-6.1	-4.5
10.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	12366	-6.1	-5.3
11.	9,12-Octadecadienoic acid, methyl Ester	8203	-4.9	-5.2
12.	Oleic Acid	445639	-4.7	-5.2
13.	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	3931	-6.4	-5.0
14.	Eicosanoic acid	10467	-6.4	-5.0
15.	cis-13,16-Docosadienoic acid	5312554	<u>-7.6</u>	<u>-7.3</u>
16.	cis-11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	6430995	-6.3	-4.2
17.	Methyl 19-hexacosenoate	91692796	-6.5	-4.1
18.	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β , 5 α)-	22213932	<u>-7.1</u>	<u>-8.0</u>
19.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	21159744	-6.7	-5.4
20.	Palmitic acid β -monoglyceride	123409	-4.6	-5.4
21.	Clomifene (Control)	2800	<u>-6.8</u>	<u>-6.4</u>



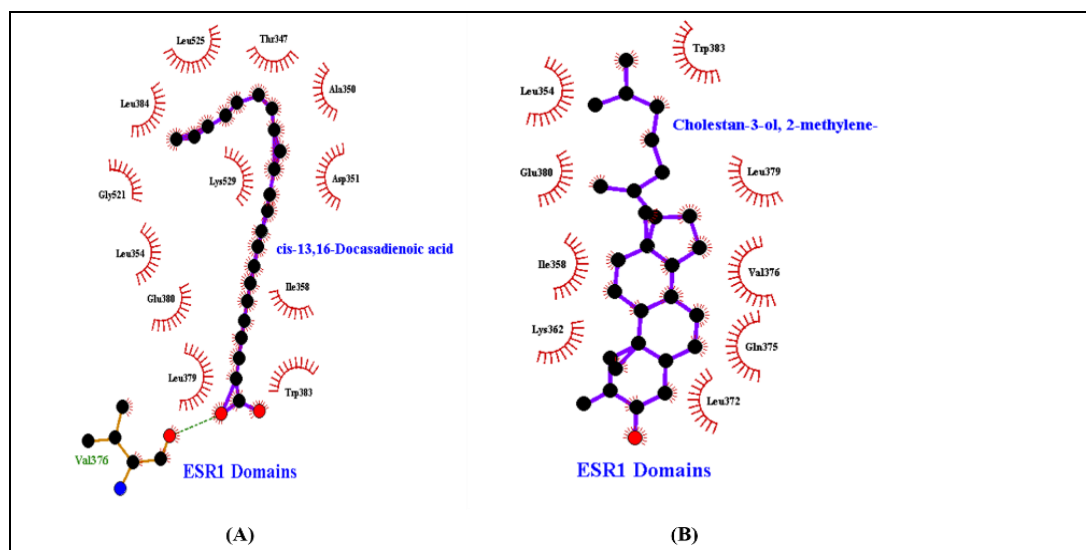
Targets-ligand structural visualization from the docking simulation. (A) cis-13,16-Docosadienoic acid_ESR1, (B) Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_ESR1, (C) cis-13,16-Docosadienoic acid_GDF9, (D) Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_GDF9

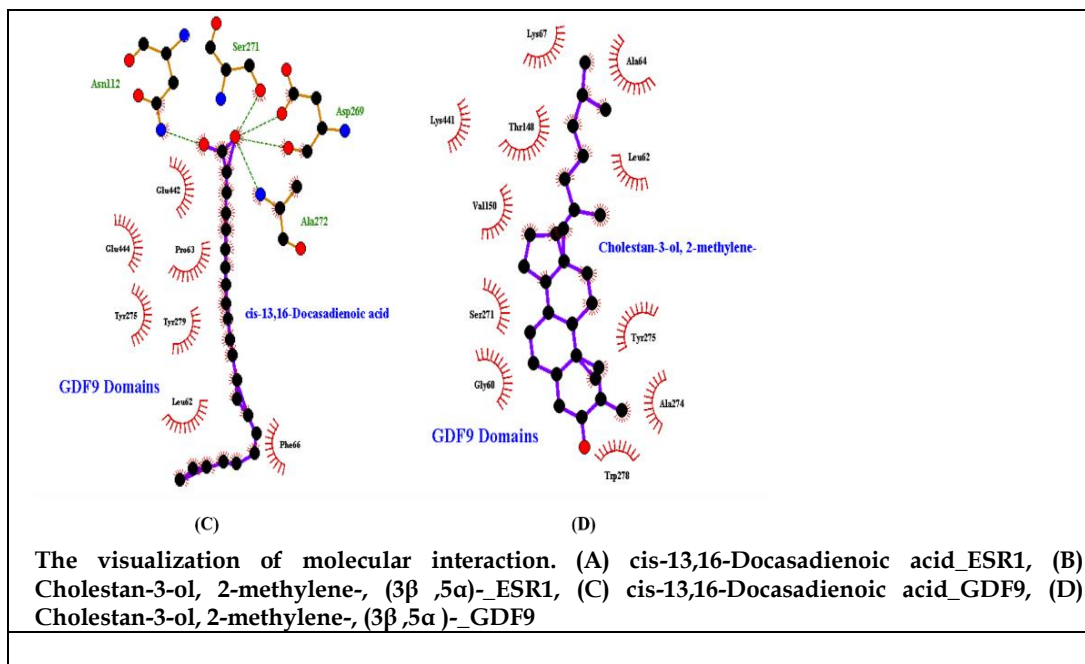
Interaksi molekuler antara protein target dan ligan

Pada hasil analisis interaksi molekuler menunjukkan cis-13,16-Docosadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)- dapat membentuk interaksi ikatan lemah yang terdiri atas hidrogen dan hidrofobik (Figure 4). Kedua senyawa tersebut memiliki kesamaan posisi interaksi melalui Leu354, Glu380, Leu379, Trp383, Ile358, Val376 pada domain ESR1 dan GDF9 melalui Tyr275, Leu62, Ser271, posisi warna kuning adalah domain ESR1 dan warna biru adalah domain GDF9 (Table 4).

Table 3. The results of chemical interaction analysis

Ligan-protein	Chemical Interaction
cis-13,16-Docosadienoic acid_ESR1	Hydrophobic: Leu525, Thr347, Ala350, Leu384, Gly521, <u>Leu354</u> , <u>Glu380</u> , <u>Leu379</u> , <u>Trp383</u> , <u>Ile358</u> , Lys529, Asp351 Hydrogen: <u>Val376</u>
Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_ESR1	Hydrophobic: <u>Leu354</u> , <u>Glu380</u> , <u>Ile358</u> , Lys362, Leu372, Gln375, <u>Val376</u> , <u>Leu379</u> , <u>Trp383</u>
cis-13,16-Docosadienoic acid_GDF9	Hydrophobic: Glu442, Pro63, Tyr279, Glu444, <u>Tyr275</u> , <u>Leu62</u> , Phe66 Hydrogen: <u>Asn112</u> , <u>Ser271</u> , Asp269, Ala272
Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β ,5 α)-_GDF9	Hydrophobic: Lys67, Thr148, Lys441, Val150, <u>Ser271</u> , Gly60, Trp278, Ala274, <u>Tyr275</u> , <u>Leu62</u> , Ala64





DISCUSSION

GDF9 dan ESR1 merupakan protein penting dalam proses pembentukan folikel di dalam ovarium. GDF9 menstimulasi deferensiasi sel granulosa, termasuk menginduksi reseptor LH dan steroidogenesis (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013a)(Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013b). Sedangkan ESR1 berfungsi sebagai mediator hormone esterogen yang memainkan peran penting dalam hormon pertumbuhan pada sistem reproduksi, pemicu untuk ovulasi, dan juga berfungsi untuk mempertahankan perkembangan oosit. Hormon estrogen disekresi oleh sel-sel granulosa penyusun folikel ovarium (Hamilton et al., 2017; Karim Rumi et al., 2017).

Pada penelitian ini, kami melakukan molecular docking antara senyawa (ligan) dari *Nigella sativa* dengan protein target yaitu protein GDF9 dan ESR1 untuk melihat potensi ligan tersebut mempengaruhi protein target. Identifikasi druglikeness digunakan untuk mengetahui kemiripan sifat pada senyawa query dengan molekul obat dengan mengacu pada sifat fisikokimia melalui parameter seperti Lipinski, Ghose, Veber, dan Eggan, pada SwissADME, senyawa harus memenuhi minimal satu aturan agar disebut sebagai drug-like molecule. Bioavailability obat menunjukkan kemampuan beredarnya obat pada tubuh dengan skor ideal >0.25 (Daina et al., 2017; Martin, 2005). Hasil identifikasi kemiripan obat menunjukkan bahwa semua ligan senyawa *Nigella sativa* memenuhi syarat parameter kemiripan obat karena memenuhi minimal satu aturan dengan skor bioavailability 0.55 (Tabel 2).

Molecular docking dapat mengidentifikasi pola interaksi molekul dan penilaian tingkat aktivitas ikatan ligan pada target. Kemampuan aktivitas ligan mengacu pada tingkat skor binding energy. Binding affinity adalah energi negatif yang terbentuk ketika ligan berikatan dengan target (Aini

et al., 2022). Tingkat aktivitas ligan ditentukan oleh nilai binding affinity yang terbentuk ketika berinteraksi dengan target. Nilai negatif dari binding affinity menentukan kekuatan ikatan, nilai lebih negatif menunjukkan ikatan ligan yang paling kuat (Wijaya et al., 2021). Senyawa kandidat dengan nilai binding affinity lebih negatif dan berikatan pada domain fungsional dapat berperan sebagai aktivator pada protein target. Pada penelitian ini senyawa cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β , 5 α)- memiliki binding affinity lebih negatif dibanding senyawa lainnya dan clomifene (control). Hasil ini menunjukkan bahwa cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β , 5 α)- pada ekstrak *Nigella sativa* potensi untuk mempengaruhi sifat fisiologis dari protein target karena mereka memiliki kemampuan mengikat lebih tinggi dibandingkan clomifene. Kedua senyawa tersebut diprediksi dapat memicu aktivasi ESR1 dan GDF9.

Visualisasi docking merupakan suatu metode untuk melihat bagaimana interaksi hasil penambatan antara ligan dengan protein target. Visualisasi ini mampu memperlihatkan bagaimana interaksi antara residu asam amino dengan ligan. Interaksi yang terjadi dapat berupa ikatan nonkovalen, seperti elektrostatis, interaksi Van der Waals, ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang terjadi akibat adanya gaya tarik menarik atom hidrogen dengan atom lain yang keelektronegatifannya besar pada suatu molekul. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang paling kuat diantara ikatan lainnya. Sedangkan ikatan hidrofobik memiliki peran yang penting dalam kestabilan ligan terhadap reseptor. Ikatan hidrofobik adalah ikatan yang cenderung menghindari lingkungan yang bersifat cair dan berkelompok di bagian dalam struktur protein untuk meminimalkan interaksi dengan air yang dapat mengakibatkan kerusakan struktur protein (Lins & Brasseur, 1995; Patrick, 2013). Berdasarkan hasil penelitian, interaksi molekuler menunjukkan cis-13,16-Docasadienoic acid dan Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β , 5 α)- dapat membentuk interaksi ikatan lemah yang terdiri atas hidrogen dan hidrofobik. Kedua senyawa tersebut memiliki kesamaan posisi interaksi melalui Leu354, Glu380, Leu379, Trp383, Ile358, Val376 pada domain ESR1 dan GDF9 melalui Tyr275, Leu62, Ser271. Posisi interaksi pada target yang sama dari kedua senyawa query diprediksi sebagai sisi fungsional yang berperan untuk memicu aktivasi target.

CONCLUSION

Senyawa kimia dari *Nigella sativa* yang terdiri atas cis-13,16-Docasadienoic acid & Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3 β , 5 α)- dapat berperan sebagai kandidat aktivator protein ESR1 dan GDF9 yang baik karena kedua senyawa tersebut memiliki nilai binding affinity lebih negatif dibandingkan senyawa kontrol (Clomifene) dan membentuk interaksi ikatan lemah seperti hidrogen dan hidrofobik. Ikatan lemah dapat memicu aktivitas ligan untuk mempengaruhi aktivasi kedua target kemudian memicu respon dalam peningkatan fertilitas.

CONFLICT OF INTEREST

Tidak ada konflik kepentingan pada penelitian ini

ACKNOWLEDGMENT

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua orang yang

memberikan dukungan dan saran yang berguna dalam penelitian ini. Penelitian ini tidak menerima hibah khusus dari lembaga pendanaan di sector public, komersial, atau nirlaba.

REFERENCES

- Aini, N. S., Kharisma, V. D., Widyananda, M. H., Murtadlo, A. A. A., Probojati, R. T., Turista, D. D. R., Tamam, M. B., Jakhmola, V., Novaliendry, D., Mandeli, R. S., Oktavia, B., Albari, M. T., Al Aziz, S., Ghifari, M. R., Suryani, O., Azhari, P., Ghifari, M. A., Purnamasari, D., Samala, A. D., ... Zainul, R. (2022). Bioactive Compounds from Purslane (*Portulaca oleracea* L.) and Star Anise (*Illicium verum* Hook) as SARS-CoV-2 Antiviral Agent via Dual Inhibitor Mechanism: In Silico Approach. *Pharmacognosy Journal*, 14(4), 352–357. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.106>
- Alam, M. H., Lee, J., & Miyano, T. (2018). GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 423–431. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-078>
- Arnal, J. F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., & Katzenellenbogen, J. (2017). Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: From tissue specificity to medical implications. *Physiological Reviews*, 97(3), 1045–1087. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Datta, J., Palmer, M. J., Tanton, C., Gibson, L. J., Jones, K. G., Macdowall, W., Glasier, A., Sonnenberg, P., Field, N., Mercer, C. H., Johnson, A. M., & Wellings, K. (2016). Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction*, 31(9), 2108–2118. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew123>
- Dibha, A. F., Wahyuningsih, S., Ansori, A. N. M., Kharisma, V. D., Widyananda, M. H., Parikesit, A. A., Sibero, M. T., Probojati, R. T., Murtadlo, A. A. A., Trinugroho, J. P., Sucipto, T. H., Turista, D. D. R., Rosadi, I., Ullah, M. E., Jakhmola, V., & Zainul, R. (2022). Utilization of Secondary Metabolites in Algae *Kappaphycus alvarezii* as a Breast Cancer Drug with a Computational Method. *Pharmacognosy Journal*, 14(3), 536–543. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.68>
- Durán-Pastén, M. L., & Fiordelisio, T. (2013a). GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Frontiers in Endocrinology*, 4(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00127>
- Durán-Pastén, M. L., & Fiordelisio, T. (2013b). GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Frontiers in Endocrinology*, 4(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00127>
- Emori, C., & Sugiura, K. (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal*, 85(6), 627–633. <https://doi.org/10.1111/asj.12200>
- Fritz, M. A. dan L. S. (2011). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* (8 th Editi). Lippincott Williams & Wilkin.

- Haas, J., & Casper, R. F. (2017). In vitro fertilization treatments with the use of clomiphene citrate or letrozole. *Fertility and Sterility*, 108(4), 568–571. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.08.017>
- Halimah, A. N., & Winarni, S. (2018). Reproduksi Organ Pada Wanita Dengan Masalah Fertilitas di RSI Sultan Agung. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 6(4).
- Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 125). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>
- Hannan, M Abdul; Rahman, M Ataur; Sohag, Abdullah Al Mamun; Uddin, Jamal; Dash, Raju ; Sikder, Mahmudul Hasan; Rahman, Saidur; Munni, Yeasmin Akter; Timalsina, B. ; & Mohibbullah; Sarker, P. P. et all. (2021). Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*, 13(1784), 1–60.
- Karim Rumi, M. A., Singh, P., Roby, K. F., Zhao, X., Iqbal, K., Ratri, A., Lei, T., Cui, W., Borosha, S., Dhakal, P., Kubota, K., Chakraborty, D., Vivian, J. L., Wolfe, M. W., & Soares, M. J. (2017). Defining the role of estrogen receptor b in the regulation of female fertility. *Endocrinology*, 158(7), 2330–2343. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1916>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). *PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces*. 49(November 2020), 1388–1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Lins, L., & Brasseur, R. (1995). The hydrophobic effect in protein folding. *The FASEB Journal*, 9(7), 535–540. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737462>
- Martin, Y. C. (2005). A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(9), 3164–3170. <https://doi.org/10.1021/jm0492002>
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178–2180. <https://doi.org/10.1126/science.1071965>
- Nivetha, K., & Prasanna, G. (2016). *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences GC-MS and FT-IR Analysis of Nigella sativa L. Seeds*. 3(6), 45–54.
- Patel, S., Zhou, C., Rattan, S., & Flaws, J. A. (2015). Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary1. *Biology of Reproduction*, 93(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130336>
- Patrick, G. L. (2013). An Introduction to Medical Chemistry. In *Oxford University Press* (Fifth Edit). Oxford University Press.
- Rigsby, R. E., & Parker, A. B. (2016). Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5), 433–437. <https://doi.org/10.1002/bmb.20966>
- Sahak, M. K. A., Kabir, N., Abbas, G., Draman, S., Hashim, N. H., & Hasan Adli, D. S. (2016). The role of *Nigella sativa* and its active constituents in learning and memory. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6075679>
- Soyal, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIGa, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, 127(21), 4645–4654. <https://doi.org/10.1242/dev.127.21.4645>
- Tripathi, D., Koora, S., Satyanarayana, K., Saleem, B. S., & Jayaraman, S. (2021). Molecular docking analysis of COX-2 with compounds from *Piper longum*.

- Bioinformation*, 17(6), 623–627. <https://doi.org/doi:10.6026/97320630017623>
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., Emori, C., Sugiura, K., & Eppig, J. J. (2015). Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 92(1), 1–14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121756>
- Wijaya, R. M., Hafidzhah, M. A., Wijaya, R. M., Hafidzhah, M. A., & Kharisma, V. D. (2021). COVID-19 In Silico Drug with Zingiber officinale Natural Product Compound Library Targeting the Mpro Protein COVID-19 In Silico Drug with Zingiber officinale Natural Product Compound Library Targeting the M pro Protein. 25(3). <https://doi.org/10.7454/mss.v25i3.1244>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>