

SKRINING SENYAWA AKTIF DARI BALIK ANGIN *A. excels* (Fenzl) Benth. TERHADAP RESEPTOR *TNF-alpha convertase* (TACE) DENGAN METODE DOCKING

Samsul Hadi ^{1*}, Ana maulana¹ dan Kunti Nastiti²

¹Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Lambung mangkurat

² Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Sari Mulia

*Email: samsul.hadi@ulm.ac.id

Received: 05/07/2021 , Revised: 12/08/2021 , Accepted: 17/08/2021, Published: 18/08/2021

ABSTRAK

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) merupakan sitokin proinflamasi yang terlibat dalam berbagai penyakit seperti radang selaput otak, rematik, asma, tuberkulosis, perionitis kronis, crohn disease, hepatitis dan sinusitis hidung. Sehingga ekspresinya perlu dikontrol untuk mengatasi penyakit ini. Penelitian ini bertujuan melakukan skrining inhibitor reseptor TNF-alpha convertase (TACE) sehingga menurunkan ekspresi TNF- α . Dengan menurunnya produksi TNF- α maka dapat sebagai antiinflamasi atau immunosupresan. Salah satu tanaman yang dapat dipergunakan untuk skrining ini adalah *A.excels*. Metode yang dipergunakan untuk skrining melalui PASSonline dan Docking dengan PLANTS serta dilihat prediksi memasuki peredaran darah dengan SWISSADME. Berdasarkan PASSonline Senyawa yang memiliki skor *probability to be active* immunosupreasant tinggi adalah batulinic acid (0,724), alphitolic acid (0,763), cis-coumaroyl alphitolic acid (0,771). Sedangkan yang memiliki *probability to be active* antiinflamasi adalah batulinic acid (0,741) dan cis-coumaroyl alphitolic acid (0,783). Berdasarkan stabilitas interaksi, senyawa yang memiliki kemampuan minimal 80% terhadap ligand referensi adalah alphonin (98,25%), alphetoxide (92,33%), cis-coumaroyl alphitolic acid (98,31%). Kesimpulannya senyawa yang berpotensi yang memiliki stabilitas interaksi yang bagus adalah cis-coumaroyl alphitolic acid dan alphonin

Kata kunci : TNF- α , *A.excels*, stabilitas interaksi

ABSTRACT

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a proinflammatory cytokine that is involved in various diseases such as meningitis, rheumatism, asthma, tuberculosis, chronic perionitis, Crohn's disease, hepatitis and nasal sinusitis. So that its expression needs to be controlled to overcome this disease. The aim of this study was to screen for TNF-alpha convertase (TACE) receptor inhibitors to reduce TNF- α expression. By decreasing TNF- expression, it can act as an anti-inflammatory or immunosuppressant. One of the plants that can be used for this screening is *A. excels*. The method used for screening is through PASSonline and Docking with PLANTS and seen the prediction of entering the blood circulation with SWISSADME. Based on PASSonline Compounds that have a high probability of immunosuppressant activity score are batulinic acid (0.724), alphitolic acid (0.763), cis-coumaroyl alphitolic acid (0.771). Meanwhile, those with anti-

inflammatory probability activity were batulinic acid (0.741) and cis-coumaroyl alphitolic acid (0.783). Based on the stability of the interaction, compounds that have a minimum ability of 80% against the reference ligand are alphonin (98.25%), alphonide (92.33%), cis-coumaroyl alphitolic acid (98.31%). In conclusion, the compound that has the potential as an immunosuppressant, anti-inflammatory and has good interaction stability is cis-coumaroyl alphitolic acid and alphonin.

Keywords: TNF- α , *A.excels*, interaction. interaction

PENDAHULUAN

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ialah sitokin yang berguna pada proses peradangan, pertahanan tubuh, reaksi kekebalan, serta kematian sel (apoptosis). Peranan TNF- α ialah menginduksi peradangan melalui faktor transkripsi yaitu melalui jalur AP-1 dan NF- κ B, yang menargetkan terhadap gen. TNF- α juga berperan dalam patogenesis penyakit tertentu khususnya inflamasi yaitu radang selaput otak, rematik, asma, tuberkulosis, perionitis kronis, *crohn diseases*, hepatitis dan sinusitis hidung (Bemelmans et al., 1996). Karena peranan yang besar ini, maka produksi berlebih dari TNF- α menjadi perhatian peneliti, khususnya bagaimana cara mengontrol produksi ini, sehingga gangguan kesehatan yang disebabkan oleh produksi TNF- α dapat tertangani. Salah satu cara mengontrol produksi TNF- α adalah dengan mencari ligand yang menduduki sisi aktif enzim *TNF-alpha convertase* (TACE). Dengan diduduki sisi aktif enzim TACE oleh senyawa maka produksi TNF- α turun (Aggarwal & Natarajan, 1996). Oleh karena

itu diperlukan skrining senyawa dari tumbuhan yang memiliki kemampuan menurunkan produksi TNF- α dengan jalan menduduki sisi aktif enzim TACE. Salah satu tanaman yang dapat dipergunakan untuk skrining reseptor TNF- α adalah balik angin.

Balik angin dengan nama latin *A. excels* telah digunakan oleh masyarakat dalam perut kembung, sakit perut dan masuk angin(William, 2021). Kandungan dari tanaman ini adalah alphitolic acid, batulinic acid, alphonin, ceanothic acid dari data base knapsack, alphonide(Branch et al., 1972), cis-coumaroyl alphitolic acid dan emmolic acid acetate (Cock, 2020). Dengan sudah ditemukan kandungan senyawa dari balik angin, maka dilakukan penelitian *docking* untuk mendapatkan data stabilitas interaksi antara senyawa dari balik angin dengan enzim TACE dan mencari konformasi yang memiliki energi terendah. Karena semakin stabil interaksi maka reaksi antara senyawa dan TACE semakin mudah (spontan) tanpa melepaskan energi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang dipergunakan adalah perangkat alat keras yaitu laptop dengan ram 2 GB dan perangkat lunak (software) yaitu marvin bean (ChemAxon, 2016), yasara (Krieger & Vriend, 2014), PLANTS (Korb et al., 2009), Discovery studio (Systèmes, 2020) dan webserver. Bahan yang di pergunakan adalah senyawa yang terkandung dalam *A. excels* yaitu alphitolic acid, batulinic acid, alphononin, ceanothic acid dari data base knapsack, alphonexolide (Branch et al., 1972), cis-coumaroyl alphonolic acid dan emmolic acid acetate (Cock, 2020) dan makromolekul *TNF-alpha convertase* (TACE) yang berikatan ligand N-((2R)-2-[2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl]-4-methylpentanoyl)-3-methyl-L-valyl-N-(2-aminoethyl)-L-alaninamide dengan kode PDB ID: 3EWJ.

Jalannya Penelitian

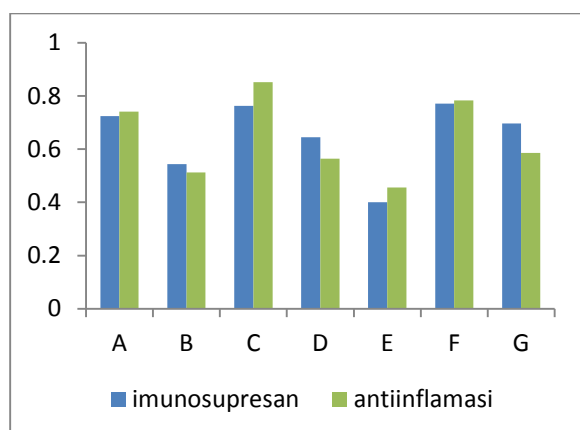
Proses *docking* dimulai dengan memisahkan ligand dari struktur 3D menggunakan yasara. Persiapan ligand dan pembuatan konformasi menggunakan Marvin bean. *Docking* menggunakan software PLANTS. Visualisasi interaksi ligand dengan residu asam amino menggunakan *discovery studio*.

Analisis Data

Analisis data dengan cara melihat skor *docking* yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

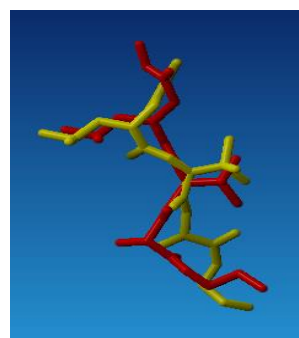
Prediksi *probability to be active A. excels* sebagai inhibitor TNF- α dapat dilihat dari berbagai macam pendekatan, yaitu sebagai immunosupresant atau antiinflamasi seperti gambar 1. Sebagai immunosupresant ini berkaitan ketika suatu antigen dipaparkan, salah satu yang dilihat adalah penurunan sitokin TNF- α , IL-17A, IL-6 (Guo et al., 2009). Sebagai antiinflamasi salah satu sisi yang dilihat adalah penurunan sitokin proinflamasi yaitu IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dan peningkatan sitokin antiinflamasi yaitu IL-4, IL-10, IL-11, dan IL-13 (Zhang & An, 2007). Sehingga diperlukan webserver untuk melihat potensi aktivitas dari komponen *A. excels* yaitu dengan PASS server. Dalam penelitian ini tidak menggunakan nilai diatas 0,7 karena nilai ini terlalu besar sehingga peneliti menggunakan *threshold probability to be active* (Pa) adalah 0,3 karena nilai ini adalah nilai minimal suatu senyawa diprediksi memiliki aktivitas tertentu. Dilihat dari gambar 1.



Gambar 1. Output PASS sever dengan kategori imunosupresant dan antiinflamatory (Y menggambarkan nilai Pa dan X adalah senyawa dari A. excels. Perbedaan warna menggambarkan potensi aktivitas yang berbeda. A adalah batulinic acid; B adalah alphononin; C adalah alphonolic acid; D adalah ceanothic acid, E adalah alphonexolide; F cis-coumaroyl alphonolic acid; G adalah emmolic acid acetate)

Semua senyawa memiliki nilai diatas 0,3. Sehingga dapat digunakan untuk proses *docking*. Jika nilai berkisar 0,3- 0,7 maka berpotensi memiliki bioaktif yang moderat sedangkan jika nilai diatas 0,7 memiliki potensi bioaktif yang tinggi(Lagunin et al., 2000). Senyawa yang memiliki Pa sebagai imunosupresan diatas 0,7 adalah batulinic acid (0,724), alphonolic acid (0,763), cis-coumaroyl alphonolic acid (0,771). Sedangkan yang memiliki Pa sebagai antiinflamasi diatas 0,7 adalah batulinic acid (0,741) dan cis-coumaroyl alphonolic acid

(0,783). Ligand referensi yang digunakan adalah (1S,3R,6S)-4-oxo-6-{4-[(2-phenylquinolin-4-yl)methoxy]phenyl} 5 azaspiro[2.4]heptane-1-carboxylic acid mempunyai nilai Pa imunosupresan sebesar 0,56 dan antiinflamasi 0,635.



Gambar 2. Visualisasi hasil *redocking* (Merah adalah ligand referensi dan kuning adalah ligand *redocking*)

Tahap selanjutnya adalah *docking* untuk melihat stabilitas interaksi. Akan tetapi terlebih dahulu dilakukan validasi *docking*, untuk melihat koordinat dan radius yang digunakan pada proses *redocking*. Pada penelitian ini koordinat yang digunakan adalah X= 6,06962 Y= 5,51062 Z: 24,6715 dan radius yang dipakai adalah 12,6623. Hasil dari *redocking* ini diperoleh nilai RMSD 1,7543 Å seperti terlihat pada gambar 2 sehingga metode ini memenuhi syarat validitas *docking* karena nilai $RMSD \leq 2 \text{ Å}$ (Rodríguez et al., 1989). Oleh karena itu metode ini dapat dipergunakan untuk ligand

yang lain terhadap makromolekul *TNF-alpha* convertase (TACE).

Tabel 1. Prediksi aktivitas biologi menggunakan PASS online

Nama ligand	Immunosupresan		Antiinflamasi	
	Pa	Pi	Pa	pi
batulinic acid	0,724	0,014	0,741	0,011
alphitonin	0,544	0,021	0,513	0,008
alphitolic acid	0,763	0,009	0,852	0,005
ceanothic acid	0,645	0,024	0,564	0,04
alphitexolide	0,401	0,065	0,456	0,071
cis-coumaroyl alphitolic acid	0,771	0,009	0,783	0,008
emmollic acid acetate	0,697	0,017	0,586	0,035

Tabel 2. Skor *docking* dan residu yang berinteraksi

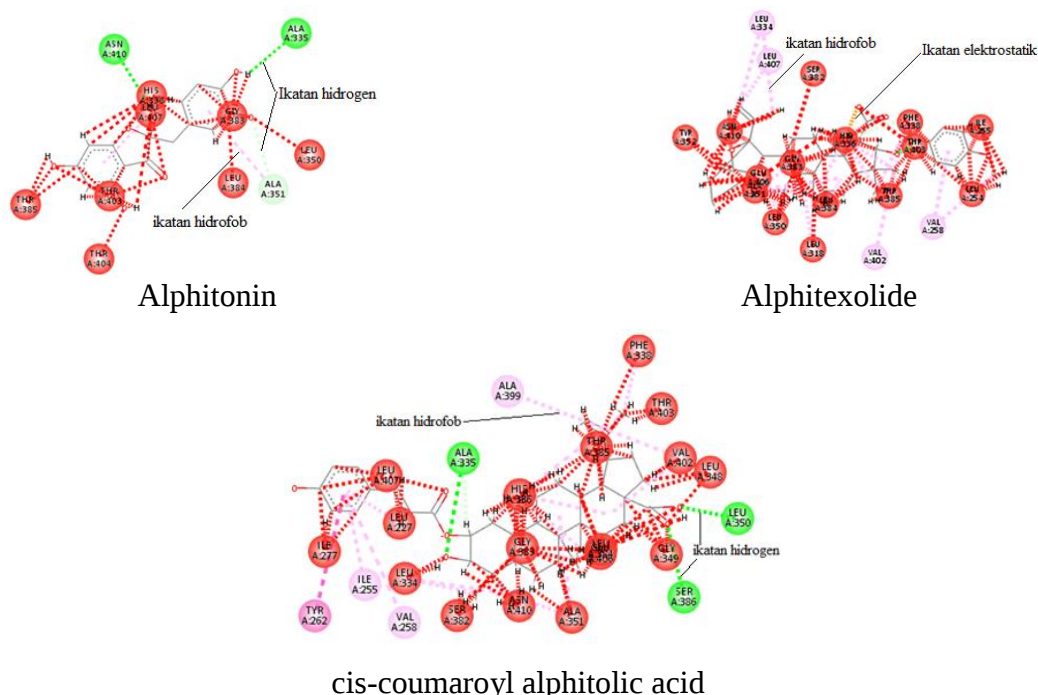
Nama ligand	Skor <i>docking</i>	Residu yang berinteraksi
Ligand referensi (1S,3R,6S)-4-oxo-6-{4-[(2-phenylquinolin-4-yl)methoxy]phenyl} 5 azaspiro [2.4]heptane-1-carboxylic acid	-92,0384	HIS336, LEU350, LEU384, LEU407, ALA335, THR403, ASN410, SER386, LEU348, GLY349, SER382, ALA351, LEU227, ILE277, LEU334, HIS336, GLU406
batulinic acid	-67,2776	SER386, ALA351, ALA399, VAL402, LEU407, LEU334, LEU254, HIS336, PHE338
alphitonin	-90,4311	ASN410, ALA335, ALA351, THR385, THR403, THR404, HIS336, LEU407, GLY383, LEU384, LEU350
alphitolic acid	-71,1558	SER386, GLY349, LEU334, ALA351, ALA399, VAL402, LEU407, LEU254, VAL402, HIS336, PHE338
ceanothic acid	-63,7751	ALA351, VAL402, LEU407, LEU318, LEU334, LEU254, ILE255, VAL258, HIS336, PHE338, TYR352
alphitexolide	-84,9804	THR403, HIS336, ALA351, LEU384, LEU350, LEU318, VAL402, LEU334, LEU407, LEU254, ILE255, VAL258, HIS336, PHE338, VAL258
cis-coumaroyl alphitolic acid	-90,4846	ALA335, LEU350, SER386, TYR262, ALA351, ALA399, VAL402, LEU334, HIS336, PHE338, LEU227, ILE255, VAL258
emmollic acid acetate	-70,0538	ASN410, LEU407, ALA351, VAL402, LEU334, LEU254, ILE255, HIS336, PHE338

Hasil dari *docking* dapat dilihat pada tabel 2. Stabilitas interaksi, dengan nilai skor *docking* minimal 80% terhadap ligand referensi adalah alphonin (98,25%), alphetexolide (92%), cis-coumaroyl alphetolic acid (98,31%). Nilai ini diperoleh dari persamaan dibawah ini.

$$= \frac{\text{skor docking ligand}}{\text{skor docking referensi}} \times 100\%$$

Alphonin dikomparatifkan dengan ligand referensi memiliki persamaan residu yang berikatan adalah ALA335, THR403, HIS336, LEU407, LLEU384, LEU350 dengan terbentuk ikatan hydrogen dengan TACE adalah ASN410, ALA335,

ALA351. Alphetexolide di komparatifkan dengan ligand referensi memiliki persamaan residu THR403, HIS336, ALA351, LEU384, LEU350, LEU334, LEU407, HIS336 dan terbentuk ikatan hydrogen dengan TACE adalah THR403, HIS336. Cis-coumaroyl alphetolic acid dikomparatifkan dengan ligand referensi memiliki persamaan residu yang yang berikatan adalah ALA335, LEU350, SER386, ALA351, LEU334, HIS336, LEU227 dan ligand ini membentuk ikatan hydrogen dengan ALA335, LEU350, SER386. Mengenai interaksi dari ketiga ligand dan dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi inetraksi antara ligand dan makromolekul Dua dimensi (Hijau adalah ikatan hidrogen, orange adalah ikatan elektrostatik dan merah dan ungu adalah hidrofob –unfavorble bump)

TACE merupakan *metalloprotease* dengan massa 26 kDa, yang diinduksi oleh suatu kondisi sehingga melepaskan pro-TNF- α dengan berat molekul 17 kDa. *Catalytic site* dari makromolekul ini ada di membran dengan urutan residu asam amino Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-|-Val-Arg-Ser-Ser-Ser (Uniprot kode: P78536) sehingga residu asam amino ini akan berpengaruh terhadap stabilitas interaksi. *Aktive site* dari makromolekul ini adalah koordinat yang berisi logam Zn yang penting untuk protonasi GLU406, sehingga sewaktu melakukan *docking* keberadaan Zn menjadi hal yang utama (Black et al., 1997). Hal ini merupakan bukti adanya elektrostatis pada ligand referensi yang berikatan residu GLU406, Ikatan hidrogen terjadi antara C=O dari GLY349 sebagai donor dan LEU384 dan GLY349 memiliki *backbone* NH sebagai akseptor (Guo et al., 2009) seperti terlihat pada tabel 1. Untuk Senyawa dari *A. excels* interaksi ini hanya terjadi antara alphetolic acid dengan GLY39, hal ini memberi penjelasan gambaran pada gambar 1. yaitu alphetolic acid walaupun skor *docking*nya kurang bagus tetapi memiliki Pa immunosupresant 0,763 dan antiinflamasi 0,783. Skor *docking* dari cis-coumaroyl

alphetolic memiliki nilai yang bagus hal ini berkaitan interaksi ligand dengan dari residu Val 402 sehingga akan meningkatkan stabilitas (Guo et al., 2009).

Tahap selanjutnya adalah melihat prediksi senyawa *A. excels* memasuki peredaran darah dengan menggunakan webserver SWISSADME. Metode *Lipinski's Rule of Five* digunakan untuk mengevaluasi senyawa dengan bentuk sediaan oral yang beredar (*Drug-likeness*) (Lipinski, 2004). Sehingga skrining ini memberikan informasi berupa kemungkinan senyawa memasuki peredaran darah, hasil skrining dapat dilihat pada tabel 3. Berdasarkan aturan ini, ligand yang diprediksi mudah memasuki peredaran darah dengan nilai $MlogP \leq 4,15$ hanyalah alphetonin. $MlogP$ adalah Moriguchi's $logP$ yaitu koefisien partisi *octanol/waater*.

Berdasarkan berat molekul yang melebihi 500 g/mol yaitu alphetoxide (618,80 g/mol); cis-coumaroyl alphetolic acid (618,84 g/mol); emmolic acid acetate (528,72 g/mol). Berat molekul berkaitan erat dengan distribusi obat melewati membran. Obat dengan berat molekul lebih dari 500 g/mol akan mengalami kesulitan memasuki membran. (Lipinski, 2004).

Tabel 3. Prediksi senyawa *A. excels* memasuki peredaran darah.

Nama Ligand	Log P	Donor Proton	Akseptor Proton	Berat Molekul	Mlog P
batulinic acid	3,81	2	3	456,7	4,86
alphitonin	1,35	5	7	304,25	-0,23
alphitolic acid	3,72	3	4	472,7	4,97
ceanothic acid	3,11	3	5	486,68	4,86
alphitexolide	4,5	1	7	618,80 g/mol	5,71
cis-coumaroyl alphitolic acid	4,97	3	6	618,84 g/mol	5,61
emmolic acid acetate	3,45	2	5	528,72 g/mol	5,14

KESIMPULAN

Kesimpulannya senyawa yang berpotensi sebagai immunosupresant, antiinflamasi dan yang memiliki stabilitas interaksi yang bagus adalah cis-coumaroyl alphitolic acid dan alphitonin.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B. B., & Natarajan, K. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *European Cytokine Network*, 7(2), 93–124.
- Bemelmans, M. H., van Tits, L. J., & Buurman, W. A. (1996). Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Critical Reviews in Immunology*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1615/critrevimmuno.1.v16.i1.10>
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M.

- F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385(6618), 729–733. <https://doi.org/10.1038/385729a0>
- Branch, G., Burgess, D., Dunstan, P., Foo, L., Green, G., Mack, J. G., Ritchie, E., & Taylor, W. (1972). Constituents of *Alphitonia* Species. III. Alphitexolide, a New Triterpene, and Other Extractives. *Australian Journal of Chemistry*, 25(10), 2209–2216. <https://doi.org/10.1071/CH9722209>
- ChemAxon. (2016). ChemAxon - Software Solutions and Services for Chemistry and Biology. In *MarvinSketch, Version*

- 16.10.31. <https://chemaxon.com/>
- Cock, I. E. (2020). *Alphitonia excelsa* (Fenzl) Benth. Leaf Extracts Inhibit the Growth of a Panel of Pathogenic Bacteria. *Pharmacognosy Communications*, 10(2), 67–74. <https://doi.org/10.5530/pc.2020.2.14>
- Guo, Z., Orth, P., Wong, S.-C., Lavey, B. J., Shih, N.-Y., Niu, X., Lundell, D. J., Madison, V., & Kozlowski, J. A. (2009). Discovery of novel spirocyclopropyl hydroxamate and carboxylate compounds as TACE inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(1), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.034>
- Korb, O., Stützel, T., & Exner, T. E. (2009). Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(1), 84–96. <https://doi.org/10.1021/ci800298z>
- Krieger, E., & Vriend, G. (2014). YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics*, 30(20), 2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>
- Lagunin, A., Stepanchikova, A., Filimonov, D., & Poroikov, V. (2000). PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(8), 747–748. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.8.747>
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today. Technologies*, 1(4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Nuñez, M., Medina, M., Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., Axelsson, L., Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J., Kerkeni, L., Ruano, P., Delgado, L. L., Picco, S., Villegas, L., Tonelli, F., Merlo, M., ... Masuelli, M. (1989). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. *Intech*, 32(tourism), 137–144. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Systèmes, D. (2020). *Free Download: BIOVIA Discovery Studio Visualizer - Dassault Systèmes*.

https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download#_ga=2.4935860.685747970.1587999055-a5d1c1c0-3176-11e9-a86f-e302515d21c8

William, S. (2021). *Khasiat Tanaman Balik Angin Mengatasi Sakit Perut*.
<https://pusakapusaka.com/balik-angin.html>

Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>