

INTERACTION BETWEEN ACTIVE COMPOUNDS FROM *Aegle marmelos* CORREA AS ANTI INFLAMMATION AGENT WITH COX-1 AND COX-2 RECEPTOR

INTERAKSI SENYAWA AKTIF DARI *Aegle marmelos* CORREA SEBAGAI ANTI INFLAMASI DENGAN RESEPTOR COX-1 DAN COX-2

Dany Dwi Agistia¹, Hari Purnomo², Maulana Tegar² Agung Endro Nugroho^{1,*}

¹Department Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Indonesia

²Departement Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Indonesia

ABSTRAK

The compounds in Aegle marmelos have an activity as anti inflammation. The objective of this study is to evaluate six active compounds in Aegle marmelos Correa, (E,R)- Marmin, skimmianine, (S)-aegeline, aurapten, zeorin, and dustanin as anti inflammation to the COX-1 and COX-2 as target receptors. Method: Molecular docking was done with PLANTS. Ligand preparation used MarvinSketch, and protein preparation was done by using YASARA. The result was marmin, skimmianine, aegeline, aurapten, zeorin, and dustanin have interaction with Arg120, tyr 355, and Ile 523 in COX-1 and Ser353, Arg 513, and Ser 530 in COX-2. Based on the result of molecular docking, active compounds in Aegle marmelos Correa have potency as anti inflammation agent.

Key word : Marmin, Antiinflamasi, Ligand, COX-1, Docking

ABSTRAK

Senyawa-senyawa yang terdapat dalam Aegle marmelos Correa memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui enam senyawa aktif Aegle Marmelos Correa, yaitu (E, R)-Marmin, skimmianine, (S)-aegeline, aurapten, zeorin, dan dustanin sebagai anti inflamasi pada target reseptor COX-1 dan COX-2. Metode: Docking molekuler dilakukan dengan PLANTS. Preparasi ligand menggunakan MarvinSketch, dengan menggambar senyawa MH2011 kemudian mengoptimasi. Preparasi protein dilakukan dengan program YASARA. Preparasi dilakukan dengan menghilangkan protocol docking (termasuk air jika esensial) yang tidak diperlukan. Setelah semua preparasi selesai, dilakukan docking PLANTS. Penurunan skor menunjukkan kestabilan ikatan dengan protein. Hasil: Marmin, skimmianine, aegeline, aurapten, zeorin, and dustanin berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen anti inflamasi berdasarkan interaksinya dengan residu asam amino Arg120, Tyr 355, dan Ile523 pada COX-1 dan residu asam amino Ser353, Arg513, serta Ser530 pada COX-2. Kesimpulan: Berdasarkan hasil docking molecular, senyawa aktif Aegle marmelos Correa beraktivitas sebagai antiinflamasi

Kata Kunci : Marmin, Antiinflamasi, Ligand, COX-1, Docking

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara dengan biodiversitas nomor dua di dunia memiliki banyak potensi untuk mengembangkan pengobatan berbahan dasar alam. Berbagai kandungan senyawa telah berhasil diisolasi dari tanaman untuk dikembangkan dan digunakan sebagai obat dalam terapi berbagai penyakit. Saat ini, penelusuran senyawa obat baru dari berbagai tanaman terus dilakukan, beberapa diantaranya

adalah marmin [(7-(6',7'-dihidroksigeranil-oksi)kumarin], skimmianin [4,7,8-(trimetoksifuro(2,3-b)quinolin], aegelin [*N*-[2-hidroksi-2(4-metoksifenil) etil]-3-fenil-2-propenamid], aurapten, zeorin, dan dustanin yang merupakan senyawa aktif yang banyak terkandung pada kulit batang dan kortek akar *Aegle marmelos* Correa (Nugroho *et al.*, 2010; Nugroho *et al.*, 2011^a; Nugroho *et al.*, 2011^b). Marmin dilaporkan sangat poten dalam menghambat pelepasan histamin dari kultur sel RBL-2H3 melalui penghambatan Ca^{2+} uptake secara *in vitro*. Marmin dengan konsentrasi 100 μ M mampu menekan pelepasan histamin lebih dari 60% (yang diinduksi dengan DNP₂₄-BSA dan thapsigargin) dan lebih dari 50% (yang

Correspondent :

Agung Endro Nugroho
Department Pharmacologi, Faculty of Pharmacy,
Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Indonesia
E-mail : agungendronugroho@yahoo.com

diinduksi oleh ionomycin) dibandingkan kontrol dari kultur sel RBL-2H3 (Nugroho *et al.*, 2011^b). Marmin juga mampu menghambat influx Ca^{2+} ekstraseluler ke dalam sel RBL-2H3, sehingga menghambat pelepasan histamin > 70% dibandingkan kontrol (Nugroho *et al.*, 2008). Skimmianin dengan konsentrasi 100 μ M mampu menekan pelepasan histamin hingga 60% (yang diinduksi dengan DNP₂₄-BSA dan thapsigargin) dan lebih dari 70% (yang diinduksi oleh ionomycin) dibandingkan kontrol dari kultur sel RBL-2H3 (Nugroho *et al.*, 2010). Aegelin dengan konsentrasi 100 μ M mampu menekan pelepasan histamin hingga 40% (yang diinduksi dengan DNP₂₄-BSA) dan lebih dari 50% (yang diinduksi oleh thapsigargin dan ionomycin) dibandingkan kontrol dari kultur sel RBL-2H3 (Nugroho *et al.*, 2011^a). Selain itu, hasil penelitian Anas (2011).

Selain sebagai antihistamin, terdapat beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terdapat dalam *Aegle marmelos* Correa memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. Menurut Dhankhar *et al* (2011), ekstrak organik dari daun *Aegle marmelos* Correa memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi akut dan sub-akut, analgesik, serta sebagai antipiretik. Ekstrak metanolik dan ekstrak air dari biji *Aegle marmelos* Correa juga menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang cukup baik terhadap inflamasi akut dan kronis (Sharma *et al.*, 2011). Ekstrak air dari kulit batang akar *Aegle marmelos* Correa juga menunjukkan aktivitas sebagai antiinflamasi terhadap inflamasi akut dan kronis yang cukup baik (Benni *et al.*, 2011). Obat-obat antiinflamasi dibagi menjadi dua golongan utama, yaitu golongan kortikosteroid dan non-steroid. Obat Anti Inflamasi Non Steroid (OAINS) yang banyak beredar di pasaran saat ini bekerja dengan cara menghambat sintesis prostaglandin, suatu senyawa mediator inflamasi. Prostaglandin terbentuk dari asam arakidonat dengan bantuan enzim siklooksigenase (COX). Enzim ini memiliki dua isoform, yaitu COX-1 dan COX-2. Mekanisme senyawa-senyawa dalam *Aegle marmelos* Correa sebagai antiinflamasi diduga berhubungan dengan interaksi senyawa tersebut dengan enzim siklooksigenase, yaitu sebagai penghambat enzim COX-1 maupun COX-2.

Pada saat ini, pengembangan obat-obatan tidak hanya dilakukan secara eksperimental, tetapi juga dilakukan secara kimia komputasi. Dalam perkembangan obat, cara kimia komputasi memiliki beberapa keunggulan, seperti mengurangi biaya dan menghemat waktu penelitian. Cara kimia komputasi saat ini cukup banyak dilakukan dalam penemuan dan pengembangan obat untuk memprediksi penempatan gugus farmakofor (gugus fungsi

aktif) suatu molekul secara tiga dimensi (Richon, 1994). Salah satu metode yang digunakan untuk menganalisis afinitas suatu molekul obat adalah *docking* molekuler.

Docking molekuler banyak digunakan untuk memberikan gambaran tentang interaksi, ikatan, maupun afinitas suatu ligan (obat) dengan reseptornya, maupun enzim dengan substrat atau inhibitorynya. *Docking* juga dapat digunakan untuk memprediksi apakah suatu senyawa memiliki aktivitas atau tidak, serta dapat berguna dalam pengembangan senyawa dengan aktivitas yang lebih baik. Pengembangan senyawa aktif dari *Aegle marmelos* Correa sebagai antihistamin (antagonis reseptor histamin H₁) maupun antiinflamasi (inhibitor enzim COX) juga dapat dilakukan secara kimia komputasi. Pengembangan tersebut di antaranya mencakup desain senyawa dan interaksi senyawa tersebut dengan enzim atau reseptor. Dalam hal ini, senyawa aktif dari *Aegle marmelos* Correa perlu diuji interaksinya dengan reseptor H₁ maupun enzim COX-1 dan COX-2 melalui uji *in silico*. Apabila hasil uji *in silico* menunjukkan interaksi yang baik antara senyawa aktif dari *Aegle marmelos* Correa dengan reseptor H₁ maupun enzim COX, maka dapat dilakukan uji *in vivo* lebih lanjut untuk mengetahui tingkat keamanannya, sehingga senyawa tersebut dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai sediaan antihistamin maupun antisiklooksigenase (antiinflamasi) yang poten.

METODOLOGI

Bahan dan Alat Penelitian

Struktur protein-protein sebagai target maya, diunduh dari website Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Protein-protein tersebut adalah enzim COX-1 dengan kode PDB 1EQH, 1HT5, dan 1HT8; serta enzim COX-2 dengan kode PDB 6COX, 4COX, dan 3PGH. Sebagai ligan uji digunakan 6 senyawa aktif dari *Aegle marmelos* Correa, yaitu (E,R)-marmin, skimmianin, (S)-aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin. Sebagai pembanding antihistamin digunakan pembanding antiinflamasi digunakan paracetamol, aspirin, indometasin, dan celecoxib.

Alat penelitian yang dibutuhkan yaitu: seperangkat komputer (Windows-XP dengan prosesor Dual-Core dan RAM 1GB), jaringan internet, software PLANTS (<http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/plants.php>), MarvinSketch 5.2.5.1 2009 ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), YASARA 12.2.22 (<http://www.yasara.org>), Visual Molecular Dynamics 1.9.1 Windows (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>), Pendrivelinux 2009 <http://www.pendrivelinux.com>).

Tabel I. Nilai RMSD hasil validasi

Kode PDB	RMSD (Å)
1EQH	1,7758
1HT5	2,2311
1HT8	0,8130
6COX	1,2183
4COX	1,2118
3PGH	0,4394

Tabel II. Skor Docking Ligan dengan enzim COX-1

NO	Kode PDB	Ligan	Skor Docking
1	1EQH RMSD : 1,7758 Å	Native FLP (konformasi 3)	-94,7869
		(E,R)-Marmin (konformasi 5)	-88,4930
		Skimmianin (konformasi 2)	-69,0035
		(S)-Aegelin (konformasi 4)	-87,5282
		Aurapten (konformasi 10)	-89,2538
		Zeorin (konformasi 10)	-25,7431
		Dustanin (konformasi 10)	-16,9143
		Paracetamol (konformasi 6)	-65,3364
		Aspirin (konformasi 10)	-67,0704
		Indometasin (konformasi 9)	-74,5894
		Celecoxib (konformasi 1)	-45,6009
2	1HT5 RMSD : 2,2311 Å	Native FL2 (konformasi 3)	-90,0368
		(E,R)-Marmin (konformasi 8)	-91,5791
		Skimmianin (konformasi 2)	-69,3127
		(S)-Aegelin (konformasi 6)	-89,0779
		Aurapten (konformasi 6)	-95,5941
		Zeorin (konformasi 10)	-41,8568
		Dustanin (konformasi 5)	-40,7153
		Paracetamol (konformasi 8)	-67,6595
		Aspirin (konformasi 8)	-70,4562
		Indometasin (konformasi 10)	-92,2391
		Celecoxib (konformasi 3)	-63,8106
3	1HT8 RMSD : 0,8130 Å	Native 34C (konformasi 1)	-84,5337
		(E,R)-Marmin (konformasi 7)	-87,7189
		Skimmianin (konformasi 2)	-65,1815
		(S)-Aegelin (konformasi 2)	-91,4108
		Aurapten (konformasi 4)	-94,0435
		Zeorin (konformasi 5)	-15,1772
		Dustanin (konformasi 1)	-19,0637
		Paracetamol (konformasi 4)	-65,4839
		Aspirin (konformasi 7)	-70,1549
		Indometasin (konformasi 10)	-88,9998
		Celecoxib (konformasi 3)	-66,0344

Preparasi ligan

Senyawa yang digunakan dalam penelitian yaitu Aegle marmelos Correa, yaitu (E,R)-marmin, skimmianin, (S)-aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin. Senyawa ini digambarkan struktur dua dimensinya secara manual menggunakan MarvinSketch (program manual menggunakan ChemAxon 5.2). Kemudian struktur yang terbentuk dilakukan optimasi protonation dengan metode *Major*

Microspecies untuk mendapatkan struktur yang disesuaikan dengan PH darah. Optimasi berikutnya adalah menentukan konformasi yang paling sesuai dan cocok dengan reseptor COX-1 dan COX-2, penentuan konformasi ini dengan menggunakan metode *conformers*. Terdapat 10 konformasi yang mewakili semua posisi ligand terhadap pocket. Konformasi yang paling sesuai dapat diketahui dengan docking PLANT.

Tabel III. Skor *Docking* Ligan dengan enzim COX-2

NO	Kode PDB	Ligan	Skor Docking		
1	6COX RMSD : 1,2183 Å	Native SC-558 (konformasi 3)	-71,5020		
		(E,R)-Marmin (konformasi 1)	-86,8678		
		Skimmianin (konformasi 6)	-72,9922		
		(S)-Aegelin (konformasi 7)	-96,2835		
		Auraptin (konformasi 3)	-87,3071		
		Zeorin (konformasi 3)	-39,4475		
		Dustanin (konformasi 6)	-41,9447		
		Paracetamol (konformasi 6)	-67,4056		
		Aspirin (konformasi 9)	-72,1648		
		Indometasin (konformasi 6)	-101,4380		
		Celecoxib (konformasi 5)	-85,6108		
		2	4COX RMSD : 1,2118 Å	Native IMN (konformasi 10)	-87,6053
				(E,R)-Marmin (konformasi 2)	-94,9186
Skimmianin (konformasi 2)	-69,8888				
(S)-Aegelin (konformasi 8)	-97,5863				
Auraptin (konformasi 10)	-94,2375				
Zeorin (konformasi 4)	-54,2411				
Dustanin (konformasi 5)	-67,6303				
Paracetamol (konformasi 1)	-68,7735				
Aspirin (konformasi 10)	-74,6695				
Indometasin (konformasi 9)	-106,419				
Celecoxib (konformasi 3)	-81,4847				
3	3PGH RMSD : 0,4394 Å			Native FLP (konformasi 3)	-88,7400
				(E,R)-Marmin (konformasi 5)	-96,2381
		Skimmianin (konformasi 1)	-72,8249		
		(S)-Aegelin (konformasi 1)	-97,2794		
		Auraptin (konformasi 1)	-94,2722		
		Zeorin (konformasi 1)	-45,6478		
		Dustanin (konformasi 7)	-55,9832		
		Paracetamol (konformasi 6)	-70,8967		
		Aspirin (konformasi 10)	-75,3236		
		Indometasin (konformasi 10)	-97,7794		
		Celecoxib (konformasi 3)	-82,0446		

Preparasi Protein Enzim

Homologi modeling dilakukan dengan membuka program YASARA. File fasta dari 6COX, kemudian load file pdb 6COX ke YASARA. Kemudian dihapus bagian dari sistem yang tidak diperlukan dalam protocol docking (yang dibutuhkan hanya satu protein, termasuk air jika esensial, dan satu ligan). Delete chain B (Edit > Delete > Molecule); pilih sequence B, Name B, Belongs to or has All, dan klik "OK". Delete deterjen (NAG) yang masih ada dalam sistem (Edit > Delete > Residu); pilih name NAG, Belongs to or has All, dan klik "OK". Tambahkan hydrogen ke dalam system dengan bantuan YASARA, sebab resolusi struktur Kristal tidak mampu memprediksi keberadaan hydrogen (Edit > Add > Hydrogen to: all). Simpan file sebagai YASARA Object (File > Save as > YASARA Object), simpan sebagai COX-2.yob.

Delete ligand asli sehingga hanya menyisakan protein target saja dengan pocket untuk docking (Edit > Delete > Residue); Pilih Name S58, Belongs to or has All, klik "OK", simpan sebagai protein.mol2. Koordinat pocket dapat diketahui dengan merujuk pada koordinat ligan 3D asli. Untuk itu hanya diperlukan file mol2 yang hanya berisi ligand asli.

Docking PLANTS

Buka "console" di Co-PendriveLinux-KDE, kemudian ketik perintah "cp /mnt/win/docking_plants/PLANTS PLANTS". Setelah muncul perintah berikutnya ketik "chmod u+x PLANTS" lanjutkan dengan "./PLANTS" untuk mengaktifkan program PLANTS. Untuk memasukkan protocol docking yang diperlukan ketik "cp /mnt/win/docking_plants/*.mol2." kemudian aktifkan plantsconfig dalam proses

docking "cp /mnt/win/docking_plants/ plants-config." lalu ketik "./PLANTS mode bind ref_ligand.mol2 5 protein.mol2" untuk memasukkan pocket ke dalam protein yang digunakan sebagai tempat berikatannya dengan reseptor. apabila terdapat peringatan "PLANTS warning" maka dilakukan perbaikan secara manual dengan cara mengetik "kwrite ref_ligand.mol2" kemudian ganti "S.O2" dengan "S.o2", setelah di save maka perbaikan sudah dilakukan.

Setelah dilakukan perbaikan pada ref_ligand maka ketik "grep -Ev "# binding site definition" plantsconfig > temp_conf" lanjutkan dengan "grep -Ev "bindingsite_" temp_conf > temp_conf2". Untuk mengaktifkan pesan galat diatas ketik "cat temp_conf2 bindingsite.def > plantsconfig". Setelah semua preparasi selesai maka *running docking* dilakukan dengan mengetik "./PLANTS --mode screen plantsconfig" kemudian akan muncul 10 konformasi ligand yang berikatan dengan 6COX dan 1HT8 dengan energi yang berbeda-beda. Untuk evaluasi dan iterpretasi data hasil *docking* ketik "cd results/" lanjutkan dengan "more bestranking.csv". hasil skor *docking* akan muncul, kemudian dari 10 input konformasi dipilih yang memiliki energi paling kecil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi Metode Docking

Validasi metode docking pada penelitian ini dilakukan dengan *re-docking* ligan *native* pada tiap kelompok protein yang diunduh dari situs PDB (*Protein Data Bank*). Untuk evaluasi validasi, parameter yang dilihat adalah RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dan pose secara visual (Moitessier *et al.*, 2008). RMSD merupakan pengukuran dua pose dengan membandingkan posisi atom antara struktur eksperimental dengan struktur yang di-*docking*-kan atau yang diprediksi (Hawkins *et al.*, 2008). Nilai RMSD < 2,0 Å biasanya digunakan sebagai kriteria kesuksesan metode *docking* (Jain and Nicholls, 2008; Moitessier *et al.*, 2008). Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa pose ligan yang diprediksi semakin baik karena semakin mendekati konformasi *native*. Akan tetapi, sebenarnya belum ada standar nilai RMSD yang digunakan sebagai parameter kesuksesan metode *docking*.

Tahap awal pada proses validasi ini adalah pemilihan protein, serta preparasi protein dan ligan. Pemilihan protein dari situs PDB didasarkan pada protein yang diinginkan untuk diuji. Untuk enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dipilih protein dengan kode PDB 1EQH, 1HT5, dan 1HT8. PDB dengan kode 1EQH merupakan kompleks enzim COX-1 dengan flurbiprofen, 1HT5 merupakan kompleks enzim COX-1 dengan metil ester

flurbiprofen, sedangkan 1HT8 merupakan kompleks enzim COX-1 dengan alclofenac. Untuk enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dipilih protein dengan kode PDB 6COX, 4COX, dan 3PGH. PDB dengan kode 6COX merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor selektif SC-558, 4COX merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor non-selektif Indometasin, sedangkan 3PGH merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor non-selektif Flurbiprofen.

Dari hasil *scoring* di atas, telah diketahui masing-masing konformasi paling optimal yang menghasilkan nilai terendah. Konformasi paling optimal tersebut selanjutnya akan digunakan dalam analisis RMSD (dibandingkan dengan referensinya) untuk mengetahui apakah protokol *docking* yang digunakan memiliki reproduisibilitas yang baik atau tidak. Hasil analisis RMSD dapat dilihat pada (tabel 1).

Docking Senyawa Uji pada Enzim COX-1

Dalam uji *in silico* (*docking*) senyawa marmin, skimmianin, aegelin, aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin sebagai inhibitor enzim siklooksigenase-1 (COX-1), dipilih 3 protein dari situs PDB, yaitu 1EQH, 1HT5, dan 1HT8. PDB dengan kode 1EQH merupakan kompleks enzim COX-1 dengan flurbiprofen, 1HT5 merupakan kompleks enzim COX-1 dengan metil ester flurbiprofen, sedangkan 1HT8 merupakan kompleks enzim COX-1 dengan alclofenac. Sebagai senyawa pembanding digunakan paracetamol, aspirin, indometasin, serta celecoxib.

Proses docking diawali dengan preparasi ligan uji, yaitu marmin [(7-(6',7'-dihidroksigeranil-oksi) kumarin], skimmianin [4,7,8-(trimetoksifuro(2,3-b)quinolin], aegelin [N-[2-hidroksi-2(4-metoksifenil) etil]-3-fenil-2-propenamid], aurapten, zeorin, dan dustanin, serta ligan pembanding, yaitu paracetamol, aspirin, indometasin, serta celecoxib dengan piranti lunak MarvinSketch version 5.2.5.1. Preparasi dilakukan dengan menggambarkan molekul ligan uji dan pembanding secara manual pada jendela MarvinSketch version 5.2.5.1, seperti yang terlihat pada gambar 7 dan 9 dilanjutkan dengan protonasi dan pencarian 10 konformasi yang optimal. Ligan yang telah dipreparasi kemudian di-*docking*-kan pada protein-protein yang telah divalidasi sebelumnya. Skor hasil *docking* ligan *native*, ligan uji, maupun pembanding dengan enzim COX-1 dapat dilihat pada (tabel II).

Dari hasil *docking* yang memprediksi interaksi senyawa marmin, skimmianin, aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin dengan enzim COX-1 dari protein dengan kode PDB 1EQH (tabel XIII), diketahui bahwa nilai skor dari senyawa-senyawa

tersebut masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan ligan *native*-nya, yaitu flurbiprofen. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kompleks ikatan protein dengan ligan *native* masih lebih stabil (kuat) dibandingkan dengan kompleks antara protein dengan senyawa aktif dari *Aegle marmelos* Correa. Sedangkan apabila dibandingkan dengan senyawa pembandingnya (paracetamol, aspirin, indometasin, dan celecoxib), nilai skor marmin, aegelin, dan aurapten ternyata lebih rendah, yang dapat mengindikasikan bahwa kompleks antara protein dengan marmin, aegelin, atau aurapten lebih stabil (kuat) dibandingkan dengan kompleks protein dengan senyawa pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa marmin, aegelin, dan aurapten memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antiinflamasi yang cukup poten. Sedangkan skor skimmianin, masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan indometasin, tetapi lebih rendah daripada skor paracetamol, aspirin, serta celecoxib, yang dapat berarti bahwa skimmianin juga berpotensi untuk dikembangkan sebagai antiinflamasi. Apabila skor senyawa-senyawa aktif *Aegle marmelos* Correa dibandingkan, terlihat bahwa zeorin dan dustanin menunjukkan skor yang jauh lebih tinggi, yang dapat mengindikasikan afinitas kedua senyawa tersebut pada enzim COX-1 tidak baik, serta dapat dikatakan bahwa kedua senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim COX-1.

Dari hasil visualisasi terlihat bahwa senyawa uji (marmin, skimmianin, aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin) dapat berinteraksi dengan residu asam amino *Arg120*, *Tyr 355*, serta *Ile523* dari enzim COX-1 dengan jarak ikatan yang berbeda-beda. Apabila dilihat dari jarak ikatannya, interaksi-interaksi tersebut dapat diduga berupa ikatan hidrogen, maupun gaya van der Waals. Dari hasil visualisasi juga terlihat bahwa senyawa-senyawa pembanding (paracetamol, aspirin, indometasin, dan celecoxib) dapat berinteraksi dengan *Arg120*, *Tyr 355*, serta *Ile523* dari enzim COX-1 dengan jarak ikatan yang bervariasi. Apabila dilihat dari jarak ikatannya, jarak ikatan antara residu-residu asam amino tersebut dengan ligan *native* dan indometasin (pembanding) lebih dekat bila dibandingkan dengan jarak ligan-ligan uji, sedangkan jarak senyawa pembanding lain (paracetamol, aspirin, dan celecoxib) lebih jauh. Hal tersebut menunjukkan bahwa kekuatan ikatan antara kompleks protein dengan ligan *native* maupun indometasin lebih kuat dan stabil dibandingkan dengan kompleks protein dan ligan-ligan uji, dan kompleks protein-ligan uji masih lebih kuat dan stabil daripada kompleks protein dengan paracetamol, aspirin, maupun celecoxib. Kekuatan ikatan ini juga terbukti dari skor ligan *native* dan indometasin yang memang relatif lebih

baik bila dibandingkan dengan skor ligan uji. Dengan melihat hasil *scoring* dan interaksi secara visual, marmin, aegelin, dan aurapten memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antiinflamasi (COX inhibitor).

Docking Senyawa Uji pada Enzim COX-2

Dalam uji *in silico* (*docking*) senyawa marmin, skimmianin, aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin sebagai inhibitor enzim siklooksigenase-2 (COX-2), dipilih 3 protein dari situs PDB, yaitu 6COX, 4COX, dan 3PGH. PDB dengan kode 6COX merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor selektif SC-558, 4COX merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor non-selektif Indometasin, sedangkan 3PGH merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor non-selektif Flurbiprofen.

Proses *docking* diawali dengan preparasi ligan uji, yaitu marmin [(7-(6',7'-dihidroksigeranil-oksi) kumarin], skimmianin [4,7,8-(trimetoksifuro(2,3-b)quinolin], aegelin [*N*-[2-hidroksi-2(4-metoksifenil) etil]-3-fenil-2-propenamid], aurapten, zeorin, dan dustanin, serta ligan pembanding, yaitu paracetamol, aspirin, indometasin, serta celecoxib dengan MarvinSketch *version* 5.2.5.1. Preparasi dilakukan dengan menggambarkan molekul ligan uji dan pembanding secara manual pada jendela MarvinSketch *version* 5.2.5.1, seperti yang terlihat pada gambar 7 dan 9 dilanjutkan dengan protonasi dan pencarian 10 konformasi yang optimal dan di-*docking*-kan dengan *software* PLANTS. Skor hasil *docking* ligan *native*, ligan uji, maupun pembanding pada enzim COX-2 dapat dilihat pada (tabel III)

Dari hasil *docking* yang memprediksi interaksi senyawa marmin, skimmianin, dan aegelin dengan enzim COX-2 dari protein dengan kode PDB 6COX (tabel XV), terlihat bahwa marmin, skimmianin, aegelin, dan aurapten memiliki skor yang lebih rendah dibandingkan dengan ligan *native* (SC-558). Hal ini menunjukkan bahwa kompleks antara protein dengan ligan uji tersebut lebih stabil dibandingkan dengan kompleks protein-ligan *native*. Apabila dibandingkan dengan ligan pembandingnya, skor marmin, skimmianin, aegelin, dan aurapten masih lebih tinggi daripada indometasin, tetapi lebih rendah bila dibandingkan dengan pembanding yang lain. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kompleks antara protein dengan indometasin menjadi kompleks yang paling stabil bila dibandingkan dengan kompleks protein-ligan uji, dan kompleks protein-ligan uji masih lebih stabil bila dibandingkan dengan kompleks protein-ligan pembanding lainnya (paracetamol, aspirin, dan

celecoxib). Dari keenam senyawa aktif *Aegle marmelos* Correa yang diuji, zeorin dan dustanin memiliki skor yang relatif tinggi bila dibandingkan dengan senyawa uji lain, ligan *native*, maupun pembanding yang digunakan. Hal tersebut menunjukkan bahwa afinitas zeorin dan dustanin terhadap enzim COX-2 kurang baik, dan dapat dikatakan bahwa kedua senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim COX-2. Hasil *scoring* tersebut dapat digunakan sebagai salah satu dasar pengembangan marmin, skimmianin, aegelin, serta aurapten sebagai agen antiinflamasi yang cukup poten.

Dari hasil visualisasi terlihat bahwa senyawa uji (marmin, skimmianin, aegelin, aurapten, zeorin, dan dustanin) dapat berinteraksi dengan residu asam amino *Ser353*, *Arg513*, serta *Ser530* dari enzim COX-2 dengan jarak ikatan yang bervariasi. Apabila dilihat dari jarak ikatan ligan dengan residu asam amino, interaksi-interaksi tersebut dapat diduga berupa ikatan hidrogen, maupun gaya van der Waals. Apabila dilihat dari jarak ikatannya, jarak ikatan antara residu-residu asam amino *Ser353*, *Arg513*, serta *Ser530* dengan ligan uji marmin, aegelin, dan aurapten lebih dekat bila dibandingkan dengan jarak residu-residu asam amino dengan ligan *native* dan pembanding (paracetamol, aspirin, dan celecoxib), tetapi masih lebih jauh daripada jarak residu asam amino dengan pembanding indometasin. Sedangkan jarak ikatan antara residu asam amino dengan ligan uji lain masih lebih jauh bila dibandingkan dengan ligan *native* maupun pembandingnya. Hal ini menunjukkan bahwa kekuatan ikatan antara protein dengan marmin, aegelin, maupun aurapten lebih kuat dan stabil bila dibandingkan dengan kekuatan ikatan protein dengan ligan *native*, paracetamol, aspirin, dan celecoxib, tetapi lebih lemah bila dibandingkan dengan kekuatan ikatan protein dengan indometasin. Di antara senyawa-senyawa aktif dari *Aegle marmelos* Correa yang diuji, zeorin dan dustanin memiliki kekuatan ikatan yang relatif lemah bila dibandingkan dengan kekuatan ikatan antara protein dengan ligan *native* maupun senyawa pembanding yang digunakan. Kekuatan ikatan ini juga terbukti dari hasil *scoring* yang menunjukkan bahwa indometasin memiliki skor terendah, zeorin dan dustanin memiliki skor yang relatif lebih tinggi. Dengan melihat hasil *scoring* dan interaksi secara visual, marmin, aegelin, dan aurapten memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antiinflamasi (COX inhibitor).

KESIMPULAN

Urutan senyawa dengan skor terbaik pada uji anti COX-1 adalah sebagai berikut : ligan *natve*

FLP > aurapten > (E,R)-marmin > (S)-aegelin > indometasin > skimmianin > aspirin > paracetamol > celecoxib > zeorin > dustanin (kode PDB 1EQH). Aurapten > indometasin > (E,R)-marmin > ligan *native* FL2 > (S)-aegelin > aspirin > skimmianin > paracetamol > celecoxib > zeorin > dustanin (kode PDB 1HT5). Aurapten > (S)-aegelin > indometasin > (E,R)-marmin > ligan *native* 34C > aspirin > celecoxib > paracetamol > skimmianin > dustanin > zeorin (kode PDB 1HT8). Residu-residu asam amino yang diduga terlibat dalam interaksi protein-ligan antara lain adalah *Arg120*, *Tyr 355*, dan *Ile523*.

Urutan senyawa dengan skor terbaik pada uji anti COX-2 adalah sebagai berikut : indometasin > (S)-aegelin > aurapten > (E,R)-marmin > celecoxib > skimmianin > aspirin > ligan *native* SC-558 > paracetamol > dustanin > zeorin (kode PDB 6COX). Indometasin > (S)-aegelin > (E,R)-marmin > aurapten > ligan *native* IMN > celecoxib > aspirin > skimmianin > paracetamol > dustanin > zeorin (kode PDB 4COX). Indometasin > (S)-aegelin > (E,R)-marmin > aurapten > ligan *native* FLP > celecoxib > aspirin > skimmianin > paracetamol > dustanin > zeorin (kode PDB 3PGH). Residu-residu asam amino yang diduga terlibat dalam interaksi protein-ligan antara lain adalah *Ser353*, *Arg513*, serta *Ser530*.

DAFTAR PUSTAKA

- Arul, V., Miyazaki, S., and Dhananjayan, R., 2005, Studies on The Antiinflammatory, Antipyretic and Analgesic Properties of The Leaves of *Aegle marmelos* Correa. *J. Ethnopharmacol.*, **96**(1): 159-163 *cit* Anas, Y., 2011, Pengaruh Marmin, Senyawa Aktif *Aegle marmelos* Correa terhadap Otot Polos Trakea Marmut Terisolasi, *Tesis*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Benni, J.M., Jayanthi, M.K., and Suresha, R.N., 2011, Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of *Aegle marmelos* (Bilwa) Root, *Indian J Pharmacol*, **43**(4) : 393-397.
- Botting, R. M., 2006, Inhibitors of Cyclooxygenases : Mechanisms, Selectivity and Uses, *Journal of Physiology and Pharmacology*, **57** : 113-124.
- Dijkstra, D., Stark, H., Chazot, D.L., Shenton, F.C., Leurs, R., Wertel, T. and Gutzmer, R., 2008, Human Inflammatory Dendritic Epidermal Cells Express a Functional Histamine H4 Receptor, *J Invest, Dermatol*, **128**(7) : 1696-1703.
- Escribano, L., Akin, C., Castells, M., and Schwartz, L.B., 2006, Current Options in the Treatment of Mast Cell Mediator-related

- Symptoms in Mastocytosis, *Inflamm Allergy Drugs Targets*, **5**(1) : 61-77.
- Istyastono, E.P., 2003, Quantitative Structure Activity Relationship Analysis of Curcumin and its derivatives as GST Inhibitors Based on Computational chemistry Calculation, *Indo. J. Chem*, **3**(3), 179-186.
- Jain, A. N. and Nicholls, A., 2008, Recommendations for Evaluations of Computational Methods, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **22**:133-139
- Jansen, O., Akhmedjanova, V., Angenot, L., Balansard, G., Chariot, A., Ollivier, E. *et al.*, 2006, Screening of 14 alkaloids Isolated from *Haplophyllum A. Juss.* for Their Cytotoxic Properties, *J. Ethnopharmacol.*, **105**(1-2) : 241-245.
- Kartasasmita, R. E., 2002, Perkembangan Obat Antiradang Bukan Steroid, *Acta Pharmaceutica Indonesia*, **27**(4) : 76-81.
- Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G., and Langer, T., 2008, Evaluation of The Performance of 3D Virtual Screening Protocols : RMSD Comparisons, Enrichment Assessments, and Decoy Selection---What Can We Learn from Earlier Mistakes?, *J. Comput. Aided Mol Des*, **22** : 213-228
- Kitchen, D.B., 2004, *Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery : Methods and Applications*, Albany Molecular Research, Inc. (AMRI), New York, USA.