

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

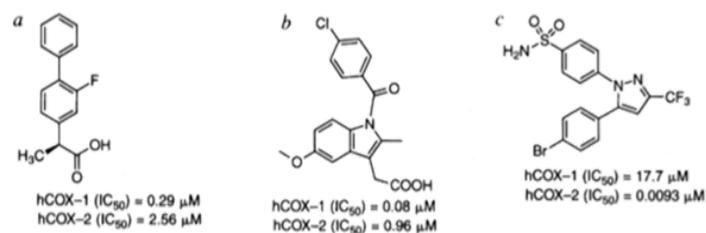
Daun jambu biji mengandung senyawa golongan flavonoid yang cukup tinggi. Flavonoid memiliki mekanisme anti-inflamasi yang beragam, salah satunya yaitu berperan besar dalam penghambat enzim pada jalur asam arakidonat Phospholipase-A2 (PLA2), Cyclooxygenase (COX), dan Lipoxygenase (LOX) (Maleki *et al.*, 2019). Penelitian yang dilakukan menggunakan metode *in silico* pada mode pengikatan flavonoid dengan COX-2 mengeksplorasi bahwa beberapa flavonol dan flavon yang mengandung 2,3-ikatan rangkap dapat bertindak sebagai penghambat COX-2 (D'mello *et al.*, 2011).

Beberapa senyawa flavonoid lainya juga ada yang pernah dilakukan uji secara *in vitro* dan *in vivo* pada penghambatan COX-2 yaitu Apigenin (IC<sub>50</sub>: 3,3 µM), Narigenin (IC<sub>50</sub>: 7,9 µM), Kaempferol (IC<sub>50</sub>: 13,1 µM), Quercetin (IC<sub>50</sub>: 13,9 µM), Daidzein (IC<sub>50</sub>: 37,6 µM) pada penghambatan biosintesis COX-2 yang diinduksi lipopolisakarida oleh makrofag dari tikus (Kartasasmita *et al.*, 2009). Formononetin (IC<sub>50</sub>: 3,98 ± 0,80 µmol/L) (Wang *et al.*, 2015). Genistein (IC<sub>50</sub>: 20,7±1,4 µM), Phloretin (IC<sub>50</sub>: 52,5 ± 3,4 µM), Catechin (IC<sub>50</sub>: 415,3 ± 25,4 µM), Epicatechin (IC<sub>50</sub>: 415,3 ± 17,0 µM) memiliki aktivitas penghambatan pada transkripsi COX-2 (Mutoh *et al.*, 2000). Delphinidin (IC<sub>50</sub>: 21,43 (uM) menghambat mediator inflamasi pada sel RAW 264,7 (E. Lee *et al.*, 2008). Daidzin (IC<sub>50</sub>: 93,15 µM), Genistin (IC<sub>50</sub>: 137,50 µM) menghambat ekspresi iNOS, COX-2 dan TLR4 yang diinduksi LPS (Subedi *et al.*, 2017). Esculin (IC<sub>50</sub>: 290 µM) menghambat LPS (Zhu & Verpoorte, 1999). Biochanin A (IC<sub>50</sub> >19,9 µM), Sissotrin (IC<sub>50</sub> >300,0 µM) menghambat asam arakidonat (Kim & Yun-Choi, 2008). Leucocyanidin (IC<sub>50</sub>: 16 ± 2 µg/mL) bersifat anti-inflamasi (Asam Raza *et al.*, 2015).

Dari data diatas maka dilakukanlah studi literatur terkait kandungan senyawa flavonoid yang berada dalam daun jambu biji dan beberapa diantaranya dilakukan

*screening* menggunakan *Lipinski rules*. Terdapat 31 senyawa uji flavonoid (Lampiran 12) yang bersumber dari Anand *et al.*, (2016); Barbalho *et al.*, (2012); Habtemariam, (2019); Jiang *et al.*, (2020). Berdasarkan data ekperimental telah dilakukan uji aktivitas penghambatan anti-inflamasi terutama COX-2 selektif menggunakan senyawa flavonoid. Beberapa senyawa flavonoid diantaranya yang juga terkandung dalam daun jambu biji. Oleh sebab itu peneliti ingin melakukan uji *in silico* penambatan molekul senyawa uji flavonoid dalam daun jambu biji dengan protein inhibitor COX-2 selektif.

Penambatan molekuler (*molecular docking*) merupakan teknik *in silico* yang dapat memprediksi model interaksi antara ligand kecil (senyawa) dengan protein target di area pengikatan yang stabil. Interaksi tersebut akan menunjukkan seberapa besar afinitas atau kemampuan suatu senyawa mengikat ke kantong protein yang ditunjukkan oleh energi ikat (*binding energy*) (Iheagwam *et al.*, 2019). Pada penelitian ini digunakan protein penghambat COX-2 selektif yang diunduh dari PDB dengan kode ID: 6COX.

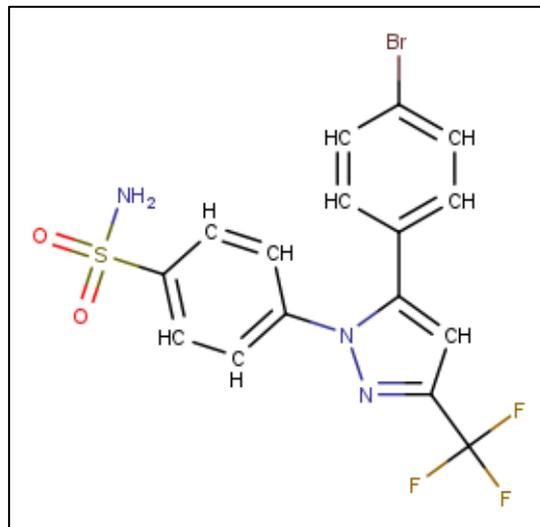


Gambar 4. 1 Perbandingan kemampuan hambat senyawa (a) Flurbiprofen, (b) Indometasin dan (c) SC-558 terhadap protein ID: 6COX

Sumber: Kurumbail *et al.*, 1996

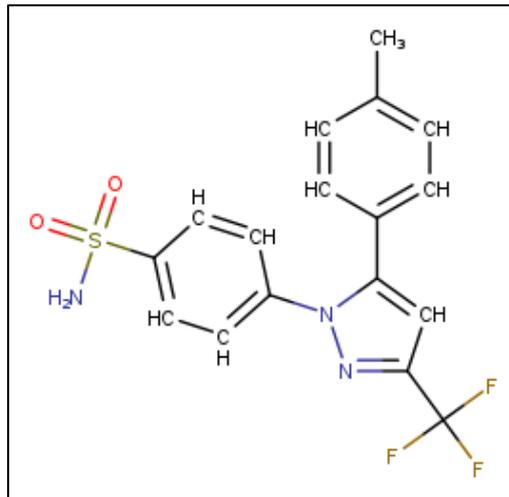
Native ligand SC-558 atau ligand asli yang berasal dari protein COX-2 dengan kode ID: 6COX mengikat sisi aktif enzim COX-2 lebih kuat 1.900 kali lipat dibandingkan COX-1. Dalam penelitian isolasi kompleks protein kode ID: 6COX menunjukkan SC-558 lebih bagus penghambatannya pada COX-2 sebesar IC<sub>50</sub>: 0,0093 μM dibandingkan dengan inhibitor senyawa Flurbiprofen (IC<sub>50</sub> : 2,65 μM)

dan Indometasin ( $IC_{50}$  : 0,96  $\mu$ M) sehingga dikatakan senyawa SC-558 lebih selektif menghambat enzim COX-2 (Kurumbail *et al.*, 1996).



Gambar 4. 2 Bentuk struktur native ligand SC-558

Pada senyawa SC-558 terdapat gugus sulfonamida (gugus sulfonil yang terhubung ke gugus amina) pada salah satu cincin fenil yang terikat dengan cincin pirazolin, gugus inilah yang menyebabkan peningkatan selektifitas penghambatan enzim COX-2 bersamaan dengan penurunan jumlah lesi lambung. Disisi lain gugus substitusi  $SO_2NH_2$  pada posisi para ditemukan berkontribusi besar dalam menghambat COX-2. Adanya cincin benzen dengan atom halogen atau rantai alkil dapat meningkatkan aktivitas inhibitor COX-2 dan munculnya atom halogen bromin juga meningkatkan penghambatan COX-2 karena peningkatan halangan sisi sterik protein serta lipofilisitasnya (Sharma *et al.*, 2019). Cincin inti pirazol memiliki aktivitas antiinflamasi penghambatan COX2 selektif yang bersifat nonulsergenik (tidak merusak mukosa lambung). Senyawa yang mengandung cincin pirazol sebagai inti pusatnya yaitu Celecoxib, SC-558, Deracoxib, SC-560, Metamizole, Antipyrine, SC-581, dan Lonazolac (Alam *et al.*, 2016).



Gambar 4. 3 Bentuk struktur senyawa pembanding Celecoxib

Senyawa pembanding Celecoxib memiliki struktur yang hampir mirip dengan native ligan SC-558, yang menjadi pembedanya yaitu substitusi metil pada cincin benzen (metilfenil) yang berperan dalam selektivitas penghambatan COX-2 (Sharma *et al.*, 2019). Gugus metil sangat berperan dalam penghambatan COX-2. Serta gugus sulfonamidafenil ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) bersifat lebih hidrofilik yang memainkan peran lemah atau kuatnya aktivitas permeasi membran sehingga memberikan efek pada peningkatan produksi mukosa lambung (Yamakawa *et al.*, 2014).

Pendekatan *docking* pada penelitian ini menggunakan metode *oriented docking* karena saat kompleks protein ID: 6COX di *input* dalam *software* Discovery Studio sudah diketahui sisi aktif penghambatan pada protein yang berada sekitar native ligand, sehingga *grid box* yang dibuat akan ditunjukkan spesifik pada daerah tersebut. Berdasarkan fleksibilitas *docking* penelitian ini mengambil metode *semi-flexible docking* (bersifat semi fleksibel) dengan membuat reseptor (protein) menjadi kaku dan ligand (senyawa) dibuat fleksibel (konformasi senyawa menyesuaikan sisi aktif protein) karena metode ini cocok untuk *docking* makromolekul dengan molekul kecil seperti protein atau asam amino dengan senyawa (Chaudhary & Mishra, 2016; Tao *et al.*, 2020).

Autodock4 merupakan *software* yang digunakan pada penelitian kali ini. *Software* ini memiliki keunggulan dengan perhitungan akurasi dan presisi energi ikat lebih tinggi dibandingkan Autodock Vina (Nguyen *et al.*, 2020). Kelebihan lainnya Autodock4 dapat menganalisis interaksi elektrostatik dan energi disolvasi yang terhitung dalam *scoring function* (Chang *et al.*, 2010). Adanya perhitungan energi disolvasi (energi yang berasal dari interaksi makromolekul-ligand di dalam larutan) memberikan hasil *score docking* yang realistis karena benar-benar mensimulasikan perhitungan ikatan reseptor-ligand di dalam tubuh yang dikelilingi oleh larutan.

Kompleks protein-ligand COX-2 dengan kode ID: 6COX yang telah di unduh pada situs PDB, akan dilakukan preparasi awal dengan menghapus molekul air. Umumnya struktur protein pada PDB mengandung molekul pelarut berupa air serta residu lainnya. Molekul air harus dihilangkan agar tidak mengganggu proses penambatan dan interaksi yang terbentuk, sehingga yang benar-benar berinteraksi hanya protein-ligand. Jika lingkungan di sekitar kompleks protein-ligand terdapat air, maka akan terbentuk ikatan hidrogen dengan air sehingga akan sulit menghitung kalkulasi interaksi ikatan hidrogen yang terbentuk murni protein-ligan. keadaan ini akan berdampak pada hasil dan kalkulasi energi kinetika dari interaksi intramolekul protein-ligand yang terbentuk yaitu tidak murni (bias) (Dermawan dkk., 2019; Lipinski, 2016).

Kemudian tambahkan atom hidrogen (*ad all hydrogen*) melalui *software* Autodock Tools, penambahan hidrogen ini dilakukan karena saat proses isolasi kompleks protein ligand terutama menggunakan metode difraksi kristalografi sinar-X akan ada beberapa atom hidrogen yang hilang. Oleh sebab itu perlu ditambahkan atom hidrogen untuk melengkapi yang hilang sehingga interaksi protein-ligand yang terbentuk sempurna (Hertadi, 2020; Yusuf dkk., 2018). Penambahan *all hydrogen* dipilih karena akan ditambahkan hidrogen polar (hidrogen yang berikatan dengan atom yang memiliki keelektronegatifitas besar seperti atom oksigen dan nitrogen) dan hidrogen non polar (hidrogen yang berikatan dengan atom karbon) (Huey & Morris, 2006). Hasil akhir kompleks protein-ligand 6COX akan disimpan dalam bentuk .pdb.

Pemisahan kompleks protein ligand ID: 6COX menggunakan *software* Discovery Studio dan hanya mengambil kompleks protein ligand rantai A dikarenakan baik rantai A dan B memiliki komposisi substansi asam amino yang sama sehingga dapat digunakan salah satunya agar lebih efisien pada proses *docking* (Sohilait *et al.*, 2017). Protein serta native ligand dipisahkan dan disimpan dalam bentuk .pdb.

Tahap selanjutnya dilakukan minimisasi energi pada protein dan ligand. Senyawa uji flavonoid, senyawa pembanding Celecoxib dan native ligand SC-558 akan dilakukan minimisasi energi menggunakan *software* Avogadro. Tidak semua senyawa uji flavonoid dan senyawa pembanding Celecoxib yang telah diunduh di situs PubChem berada dalam keadaan stabil dengan energi yang minimal walaupun sudah terstandar strukturnya. Sehingga perlu dilakukan minimalisasi energi, penggunaan *software* Avogadro dengan penambahan muatan parsial berbasis medan gaya yaitu *Merck Molecular Force Field* (MMFF94) dan optimasi geometri dapat digunakan untuk pengoptimal energi terkhusus untuk senyawa organik yang banyak terkandung dalam protein dan molekul mirip obat (Novian dkk., 2019). Keberhasilan minimisasi energi ligand dilihat dari perubahan energi sebelum dan sesudah minimasi dengan energi konformasi struktur lebih rendah setelah diminimasi (Nusantoro & Fadlan, 2020). Struktur 3D native ligand dan senyawa uji akan disimpan dalam bentuk format .pdb.

Minimisasi energi pada protein menggunakan *software* Swiss PDB Viewer dengan menggunakan medan gaya atau *force field* GROMOS 43B1. Medan gaya tunggal dari GROMOS lebih valid digunakan untuk minimisasi energi biomolekul (protein, asam nukleat, lipid, dan karbohidrat) (Soares *et al.*, 2005). Medan gaya ini memungkinkan evaluasi energi dari suatu struktur serta memperbaiki geometri melalui minimisasi energi (Kleinjung *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2013). Struktur protein yang telah diminimasi akan disimpan dalam bentuk .pdb.

Penambatan molekul kecil berupa senyawa ligan ke dalam protein dilakukan pada *software* Autodock Tools. Ligand akan dideteksi rotasinya. Rotasi sangat penting dalam proses *docking* karena menentukan konformasi ligand yang paling sesuai dengan bentuk ruang sisi aktif protein (posisi/pose terbaik), sehingga terbentuk konformasi yang stabil dengan aktivitas penghambatan COX-2 yang maksimal. Selanjutnya akan ditambahkan muatan parsial pada ligand dan protein secara otomatis oleh *software* Autodock berupa muatan gasteiger atau kollman. Muatan gasteiger ditambahkan pada ligand yang tersusun atas atom organik dan tidak mengandung asam amino. Makromolekul ditambahkan muatan kollman secara otomatis karena penyusun proteinnya terdiri dari asam amino (Huey & Morris, 2006). Penambahan muatan parsial tersebut berkontribusi dalam terbentuknya ikatan kimia yang berperan dalam menghasilkan aktivitas biologis (Hasan dkk., 2017). Kemudian *Save file* dalam tipe .pdbqt.

Sebelum melakukan penambatan ligand pada protein, perlu adanya identifikasi sisi aktif protein (*side active binding protein*) melalui parameter *grid*. *Grid box* dibuat untuk menunjukkan ruangan dimana akan terjadi interaksi antara ligand dengan asam amino pada protein target sehingga menghasilkan efek farmakologis (Susanti dkk., 2019). Penelitian ini menggunakan ukuran *grid box* yang lumayan besar, agar ligand dapat berotasi bebas dan menyesuaikan dengan bentuk sisi aktif protein sehingga didapat konformasi ligan paling stabil. Dari hasil penelitian diperoleh *grid point spacing* = 0.375 Angstroms, ukuran *grid box* (x, y, z) = (40×40×40) dan titik koordinat (x, y, z) = (22.903 points, 23.481 points, 46.936 points).

Dalam proses *docking* menggunakan parameter algoritma sebagai pencarian. Metode algoritma yang digunakan yaitu *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) adalah penggabungan algoritma *Local Search* dan *Genetic Algorithm* yang merupakan pencarian terbaik digunakan pada AutoDock sejauh ini. Algoritma tersebut akan meminimalisasi energi pada setiap pencarian konformasi ligand sehingga memberikan konformasi struktur yang stabil saat berikatan dengan protein (Atilgan & Hu, 2011). *Search run* juga diatur 100 kali sehingga terjadi 100 kali pengulangan dalam sekali proses *docking* dan menghasilkan 100 konformasi ligand

yang dimungkinkan cocok dengan ruang sisi aktif protein untuk mendapatkan *Gibbs energy of binding* atau energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) terbaik.

Kemudian dilakukan proses *docking* menggunakan *software file extension* Autodock4 dan Autogrid. Autodock4 biasanya digunakan secara akurat memodelkan penambatan molekuler dari ligand tunggal ke protein tunggal (Farkas *et al.*, 2015). *Software* Autodock4 akan membantu proses penambatan dari ligand ke sekumpulan *grid* (ruang sisi aktif protein) (Syahputra dkk., 2014). Hasil penambatan molekul didapat *file* dock.dlg yang memiliki beberapa informasi penting terkait validasi metode berupa nilai RMSD, total energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi senyawa.

Nilai validasi metode yang dilihat dari hasil RMSD yang diperoleh berdasarkan proses penambatan molekul native ligand terhadap protein kode ID: 6COX yaitu sebesar 1.064 Å. Nilai tersebut  $\leq 2$  Å yang artinya letak posisi native ligand *co-crystal* dengan ligand *re-docking* SC-558 tidak terlalu berjauhan dan konformasinya sangat mirip. Nilai RMSD *re-docking* tersebut telah memenuhi standar validasi dengan itu metode ini dapat digunakan untuk penambatan molekul senyawa uji lainnya.

#### 4.1 Energi Binding dan Konstanta Inhibisi

Hasil *docking* yang bagus salah satunya dapat dianalisis dengan membandingkan nilai energi binding atau energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) dan Konstanta Inhibisi (KI). *Binding energy Gibbs* ( $\Delta G$ ) menunjukkan kekuatan suatu ikatan ligand-reseptor (afinitas). Nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) terendah (nilainya semakin negatif) menunjukkan tingkat kestabilan ikatan ligand dan reseptor yang baik, sehingga ikatan yang terbentuk semakin kuat dan aktivitas penghambatannya maksimal (Abdillah dkk., 2017). KI berperan penting dalam evaluasi penambatan molekuler karena menentukan seberapa kuat ikatan protein-ligan hingga menghasilkan aktivitas penghambatan. Berikut merupakan hasil penambatan

dari 31 senyawa uji flavonoid daun jambu biji dengan satu senyawa pembandingan Celecoxib dan satu native ligand SC-558 pada protein ID: 6COX.

Tabel 4. 1 Nilai energi binding dan konstanta inhibisi dari penambatan molekuler pada protein ID: 6COX

No	Nama Senyawa	Energi Binding	Konstanta Inhibisi
1	SC-558	- 10,96 kcal/mol	9,30 nM (nanomolar)
2	Celecoxib	- 10,37 kcal/mol	24,84 nM (nanomolar)
3	Epicatechin-3-O-Gallate	- 9,31 kcal/mol	149,65 nM (nanomolar)
4	Galocatechin	- 8,97 kcal/mol	266,19 nM (nanomolar)
5	Tamarixetin	- 8,83 kcal/mol	335,71 nM (nanomolar)
6	Myricetin	- 8,65 kcal/mol	458,73 nM (nanomolar)
7	Leucocyanidin	- 8,45 kcal/mol	642,15 nM (nanomolar)
8	Isorhamnetin	- 8,41 kcal/mol	680,34 nM (nanomolar)
9	Cyanidin	- 8,41 kcal/mol	684,37 nM (nanomolar)
10	Phlorizin	- 8,40 kcal/mol	699,50 nM (nanomolar)
11	Guaijaverin	- 8,38 kcal/mol	718,67 nM (nanomolar)
12	Catechin	- 8,35 kcal/mol	753,51 nM (nanomolar)
13	Quercetin	- 8,34 kcal/mol	766,90 nM (nanomolar)
14	Delphinidin	- 8,33 kcal/mol	783,60 nM (nanomolar)
15	Formononetin	- 8,28 kcal/mol	850,36 nM (nanomolar)
16	Naringenin	- 8,26 kcal/mol	880,31 nM (nanomolar)
17	Epicatechin	- 8,24 kcal/mol	907,15 nM (nanomolar)
18	Apigenin	- 8,10 kcal/mol	1,16 uM (micromolar)
19	Phloretin	- 8,02 kcal/mol	1,33 uM (micromolar)
20	Gossypetin	- 8,01 kcal/mol	1,34 uM (micromolar)
21	Biochanin A	- 7,99 kcal/mol	1,40 uM (micromolar)
22	Genistein	- 7,91 kcal/mol	1,60 uM (micromolar)
23	Morin	- 7,88 kcal/mol	1,68 uM (micromolar)
24	Kaempferol	- 7,88 kcal/mol	1,69 uM (micromolar)
25	Isoformononetin	- 7,83 kcal/mol	1,81 uM (micromolar)
26	Daidzein	- 7,83 kcal/mol	1,82 uM (micromolar)
27	Esculin	- 7,81 kcal/mol	1,88 uM (micromolar)
28	Glycitein	- 7,78 kcal/mol	1,98 uM (micromolar)
29	Prunetin	- 7,64 kcal/mol	2,51 uM (micromolar)
30	Daidzin	- 5,14 kcal/mol	172,11 uM (micromolar)
31	Sissotrin	- 5,05 kcal/mol	198,63 uM (micromolar)
32	Genistin	- 4,85 kcal/mol	279,37 uM (micromolar)
33	Ononin	- 4,35 kcal/mol	651,65 uM (micromolar)

Data penambatan molekul pada protein ID: 6COX pada tabel 4.1 di dapat senyawa uji dengan nilai *docking* paling rendah yaitu senyawa Ononin dengan nilai energi ikatan bebas ( $\Delta G$ ) sebesar - 4,35 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 651,65  $\mu\text{M}$  (*micromolar*). Sedangkan hasil *docking* senyawa uji terbaik diduduki oleh senyawa Epicatechin-3-O-Gallate dengan  $\Delta G = - 9,31$  kcal/mol dan konstanta inhibisinya 149,65 nM (nanomolar), kemudian disusul oleh senyawa uji Gallocatechin  $\Delta G = - 8,97$  kcal/mol dan konstanta inhibisinya 266,19 nM (nanomolar), serta Tamarixetin  $\Delta G = - 8,83$  kcal/mol dan konstanta inhibisinya 335,71 nM (nanomolar).

Berdasarkan data hasil *docking* diperoleh nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) paling kuat yaitu native ligand SC-558 dengan nilai -10,96 kcal/mol dan senyawa pembanding Celecoxib sebesar - 10,37 kcal/mol. Senyawa uji dengan energi ikat bebas tertinggi yaitu Epicatechin-3-O-Gallate dengan nilai energi ( $\Delta G$ ) - 9,31 kcal/mol, disusul senyawa uji Gallocatechin  $\Delta G = - 8,97$  kcal/mol dan Tamarixetin  $\Delta G = - 8,83$  kcal/mol. Data tersebut menunjukkan senyawa uji yang paling stabil yaitu senyawa Epicatechin-3-O-Gallate kemudian disusul oleh senyawa Gallocatechin dan Tamarixetin. Kestabilan senyawa dapat dilihat dari energi ikatnya yang rendah. Semakin rendah energi ikatnya maka makin kuat interaksi non kovalen dan semakin spontan reaksi yang terbentuk antara ligand dengan protein (Suhadi dkk., 2019).

Dalam kata lain semakin rendah energi ikatnya maka semakin besar senyawa ligand tersebut berpotensi sebagai inhibitor COX-2 selektif. Dilihat dari senyawa uji, Epicatechin-3-O-Gallate berpotensi sebagai kandidat penghambat COX-2 namun kekuatannya lebih tinggi jika dibandingkan dengan Gallocatechin dan Tamarixetin. Tingginya nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) Epicatechin-3-O-Gallate dapat disebabkan karena lebih kuatnya interaksi non-kovalen dari senyawa ini dibandingkan Gallocatechin dan Tamarixetin pada protein target.

Konstanta Inhibisi (KI) atau kemampuan hambat suatu senyawa pada protein target paling bagus dimiliki oleh native ligand SC-558 sebesar 9,30 nM (nanomolar), urutan kedua diduduki oleh senyawa pembanding Celecoxib dengan nilai 24,84 nM (nanomolar), selanjutnya disusul senyawa uji dengan kemampuan hambat kuat yaitu senyawa Epicatechin-3-O-Gallate sebesar 149,65 nM (nanomolar), disusul senyawa uji Gallocatechin 266,19 nM (nanomolar) dan Tamarixetin 335,71 nM (nanomolar). Nilai konstanta inhibisi yang kecil berkorelasi dengan nilai energi ikat yang kecil. Hal tersebut dikarenakan nilai  $\Delta G$  negatif menunjukkan dalam energi rendah, kompleks senyawa-protein dapat berinteraksi dengan kuat (Abdillah dkk., 2017) dan semakin stabil kompleks ligand-reseptor, sehingga menghasilkan aktivitas penghambatan atau kemampuan menghambat COX-2.

Dari data tersebut senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate memiliki afinitas tertinggi atau memiliki kekuatan yang lebih besar untuk berikatan pada protein sehingga menghasilkan aktivitas biologis obat berupa penghambatan COX-2 yang lebih kuat. Dalam kata lain, senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate memiliki potensi kemampuan menghambat COX-2 lebih besar dibandingkan dengan senyawa uji lainnya. Kemampuan hambat senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa uji Gallocatechin dan Tamarixetin. Nilai konstanta inhibisi juga dapat dijadikan acuan atau pembanding dalam melakukan uji *in vitro* ( $IC_{50}$ ).

Senyawa Epicatechin-3-O-Gallate menduduki urutan senyawa uji dengan nilai *docking* terbaik, sehingga diprediksi senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate memiliki potensi anti-inflamasi sebagai inhibitor enzim COX-2 dalam uji penambatan molekuler. Sifat senyawa Epicatechin-3-O-Gallate yang diprediksi sebagai anti-inflamasi sebanding dengan penelitian eksperimental *in vitro* Kürbitz *et al.*, (2011) yang membuktikan senyawa Epicatechin Gallate terbukti mempunyai aktivitas anti-inflamasi pada sel kanker pankreas dimana terjadi penghambatan aktivasi signal NF- $\kappa$ B yang diinduksi TNF- $\alpha$ . Penelitian dari Al-

Sayed dan Abdel-Daim, (2018) juga menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dari senyawa Epicatechin Gallate pada tikus yang diinduksi karagenan secara *in vivo* dan terjadi penghambatan konsentrasi yang tinggi pada mediator anti-inflamasi PGE<sub>2</sub>. Kedua penelitian eksperimental tersebut menunjukkan senyawa uji Epicatechin Gallate memiliki aktivitas anti-inflamasi, namun masih belum ditemukan penelitian eksperimental yang menunjukkan senyawa Epicatechin Gallate spesifik menghambat enzim COX-2 sebagai anti-inflamasi.

Senyawa uji Gallocatechin berada diposisi kedua berdasarkan data *docking* setelah senyawa Epicatechin-3-O-Gallate yang dimungkinkan memiliki potensi anti-inflamasi penghambat COX-2. Prediksi tersebut dikuatkan oleh penelitian dari Gürbüz *et al.*, (2019) yang menyebutkan senyawa Gallocatechin memiliki aktivitas anti-inflamasi serta sebagai inhibitor dengan menurunkan level iNOS dan COX-2 pada sel RAW 264.7 yang diinduksi oleh LPS+IFN- $\gamma$  melalui *screening* RT-PCR.

Berdasarkan data penambatan pada protein ID: 6COX dan dilihat dari energi bebas ikatan serta konstanta inhibisinya, senyawa Tamarixetin merupakan senyawa uji ketiga yang menduduki nilai *docking* tertinggi setelah Epicatechin-3-O-Gallate dan Gallocatechin. Nilai *docking* tersebut menunjukkan senyawa uji Tamarixetin memiliki potensi sebagai penghambat enzim COX-2 selektif. Prediksi Tamarixetin sebagai inhibitor COX-2 tersebut sejalan dengan penelitian eksperimental *in vitro* dari Park *et al.*, (2018) dimana senyawa Tamarixetin memiliki aktivitas anti-inflamasi dengan menghambat fosforilasi JNK1, p38, dan Akt, serta menghambat ekspresi COX-2 pada sel dendrit yang berasal dari sumsum tulang belakang (BMDC) yang distimulasi dengan LPS.

Berdasarkan penelitian diatas telah dipaparkan bahwa tiga senyawa dengan nilai *docking* tertinggi tidak hanya berpotensi memiliki aktivitas anti-inflamasi,

namun beberapa diantaranya sudah dibuktikan secara eksperimental memiliki aktivitas anti-inflamasi terutama spesifik sebagai inhibitor COX-2.

Analisis hasil penambatan ligand terhadap protein ID: 6COX juga dapat dilihat dari penyusun total energi binding yang berasal dari energi torsi, energi intarmolekul, energi total internal, energi tidak terikat dan lain-lain. Energi intarmolekul yang berasal dari jumlah energi interaksi berupa interaksi ikatan hidrogen, ikatan Van der Waals, ikatan elektrostatik dan energi disolvasi (lampiran 16) dapat dijadikan analisis untuk mengetahui energi dari jenis interaksi residu asam amino mana saja yang memiliki potensi memberikan efek penghambatan terkuat.

#### **4.2 Interaksi Residu Asam Amino**

Pengamatan residu asam amino dari interaksi senyawa uji dengan protein target bertujuan untuk mengidentifikasi interaksi yang terjadi dan diduga berkontribusi dalam munculnya efek farmakologi seperti inhibitor COX-2 oleh senyawa uji. Interaksi ikatan tersebut berupa ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi Van der Waals, interaksi elektrostatik dan halogen. Oleh sebab itu perlu dilakukan analisis asam amino yang paling berperan dalam terbentuknya interaksi yang memunculkan efek farmakologis.

Ikatan hidrogen merupakan ikatan paling kuat di antara ikatan non-kovalen lainnya namun lebih lemah dibandingkan ikatan ion atau ikatan kovalen. Oleh sebab itu asam amino yang memiliki jenis ikatan hidrogen paling banyak dimungkinkan sebagai penyumbang terbesar dalam menghasilkan aktivitas terbaik. Sehingga penting untuk dilakukan analisis terhadap interaksi ikatan hidrogen yang terbentuk.

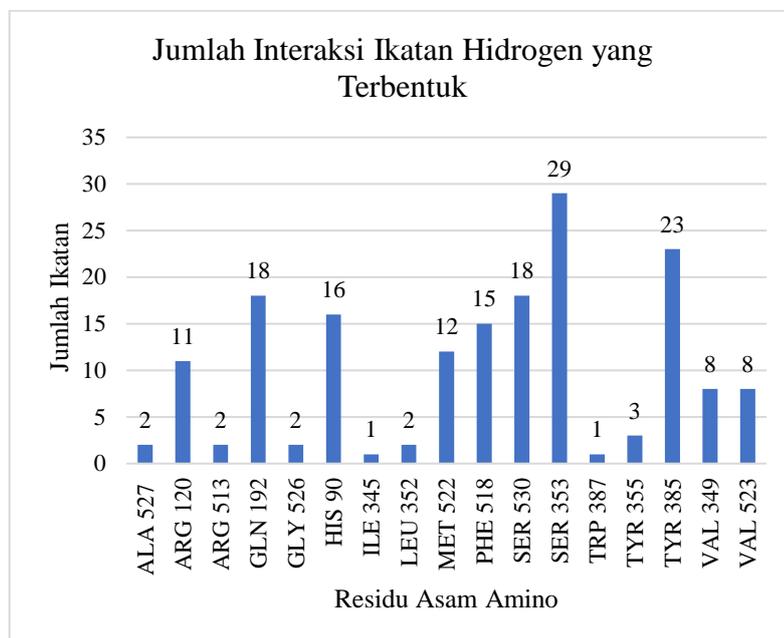
Tabel 4. 2 Data interaksi residu asam amino pembentuk ikatan hidrogen

No	Senyawa	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>	<i>Carbon Hydrogen Bond</i>	Jumlah
1	SC-558	ARG 120 (2,25 Å), ARG 120 (2,09 Å), GLN 192 (2,07 Å), LEU 352 (2,19 Å).	-	4
2	Celecoxib	ARG 120 (2,12 Å), ARG 120 (2,50 Å), GLN 192 (1,98 Å), LEU 352 (2,12 Å), PHE 518 (2,94 Å), TYR 355 (2,76 Å).	-	6
3	Epicatechin-3-O-Gallate	ARG 120 (2,09 Å), ARG 120 (2,85 Å), GLN 192 (2,14 Å), PHE 518 (2,55 Å), ARG 513 (2,22 Å).	SER 353 (2,80 Å).	6
4	Gallocatechin	GLN 192 (2,24 Å), PHE 518 (2,77 Å), MET 522 (2,20 Å), TYR 385 (2,41 Å), VAL 349 (2,47 Å), SER 353 (1,95 Å), SER 353 (2,60 Å), HIS 90 (1,99 Å) HIS 90 (2,17 Å).	-	9
5	Tamarixetin	GLN 192 (2,10 Å), PHE 518 (2,24 Å), VAL 349 (2,70 Å), SER 530 (2,10 Å), MET 522 (2,14 Å).	SER 353 (2,93 Å).	6
6	Myricetin	GLN 192 (2,16 Å), PHE 518 (2,38 Å), VAL 349 (2,83 Å), SER 353 (2,25), SER 353 (2,85 Å), HIS 90 (1,91 Å), HIS 90 (1,91 Å), MET 522 (2,01 Å).	-	8
7	Leucocyanidin	GLN 192 (2,12 Å), PHE 518 (2,66 Å), SER 353 (2,22 Å), TYR 385 (2,16 Å), TYR 385 (2,33 Å).	-	5
8	Isorhamnetin	GLN 192 (1,89 Å), PHE 518 (2,51 Å), HIS 90 (2,41 Å), SER 353 (1,88 Å), SER 530 (1,99 Å).	SER 353 (3,37 Å).	6
9	Cyanidin	GLN 192 (2,05 Å), PHE 518 (2,56 Å), TYR 385 (2,22 Å), TYR 385 (2,24 Å), HIS 90 (2,34 Å), SER 353 (2,05 Å).	-	6
10	Phlorizin	ARG 120 (1,75 Å), GLN 192 (2,06 Å), PHE 518 (2,09 Å), TYR 355 (2,27 Å), TYR 385 (2,17 Å), ALA 527 (1,84 Å),.	-	6
11	Guaijaverin	ARG 120 (1,80 Å), ARG 120 (2,12 Å), GLN 192 (1,95 Å), PHE 518 (2,59 Å), TYR 355 (2,03 Å), TYR 385 (2,42 Å), TYR 385(2,43 Å), SER 353 (2,62 Å).	SER 353 (3,28 Å)	9
12	Catechin	GLN 192 (1,92 Å), PHE 518 (2,58 Å), TYR 385 (2,71 Å), TYR 385 (2,18 Å), HIS 90 (2,51 Å), SER 353 (1,96 Å).	-	6
13	Quercetin	GLN 192 (2,01 Å), PHE 518 (2,29 Å), VAL 349 (2,67 Å), SER 530 (2,10 Å), MET 522 (2,18 Å).	-	5
14	Delphinidin	GLN 192(2,96 Å), PHE 518 (2,47 Å), TYR 385 (2,36 Å), SER 530 (2,13 Å), VAL 349 (2,85 Å), HIS 90 (1,84 Å), HIS 90 (2,05 Å) , SER 353 (2,19 Å), SER 353 (2,78 Å), MET 522 (2,26 Å).	-	10

No	Senyawa	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>	<i>Carbon Hydrogen Bond</i>	Jumlah
15	Formononetin	ARG 120 (2,01 Å), GLN 192 (2,09 Å), PHE 518 (1,69 Å).	-	3
16	Naringenin	TYR 385 (2,45 Å), MET 522 (2,07 Å), SER 530 (2,36 Å), SER 353 (2,01 Å).	-	4
17	Epicatechin	GLN 192 (2,16 Å), TYR 385 (2,23 Å), TYR 385 (2,28 Å), HIS 90 (2,52 Å), SER 353 (1,96 Å).	-	5
18	Apigenin	GLN 192 (2,08 Å), TYR 385 (1,97 Å), SER 353 (2,32 Å).	SER 353 (2,98 Å).	4
19	Phloretin	TYR 385 (2,14 Å), SER 530 (2,42 Å), SER 530 (2,45 Å), MET 522 (2,04 Å), VAL 523 (1,93 Å), HIS 90 (2,19 Å), SER 353 (2,89 Å).	-	7
20	Gossypetin	HIS 90 (1,74 Å), HIS 90 (1,85 Å), SER 353 (2,66 Å), VAL 349 (2,28 Å), SER 530 (1,69 Å), MET 522 (2,00 Å).	-	6
21	Biochanin A	TYR 385 (1,88 Å), MET 522 (2,01 Å).	SER 353 (3,13 Å), VAL 523 (3,21 Å)	4
22	Genistein	TYR 385 (1,88 Å), HIS 90 (1,93 Å), SER 353 (3,00 Å), MET 522 (2,01 Å).	VAL 523 (3,17 Å).	5
23	Morin	GLN 192 (2,12 Å), TYR 385 (2,22 Å), SER 353 (2,27 Å), VAL 523 (2,15 Å).	SER 353 (3,01 Å)	5
24	Kaempferol	HIS 90 (1,90 Å), SER 353 (2,94 Å), VAL 349 (2,51 Å), SER 530 (1,98 Å), MET 522 (2,15 Å).	-	5
25	Isoformononetin	TRP 387 (2,32 Å), MET 522 (2,37 Å), SER 530 (2,61 Å).	VAL 523 (3,56 Å)	4
26	Daidzein	TYR 385 (2,18 Å), SER 353 (2,69 Å), HIS 90 (1,84 Å).	VAL 523 (3,07 Å)	4
27	Esculin	VAL 349 (3,04 Å), TYR 385 (2,20 Å), MET 522 (1,85 Å), VAL 523 (2,44 Å)	-	4
28	Glycitein	TYR 385 (2,17 Å), SER 530 (1,70 Å).	ARG 513 (3,26 Å)	3
29	Prunetin	SER 530 (3,03 Å), ALA 527 (2,31 Å).	SER 530 (2,90 Å).	3
30	Daidzin	ARG 120 (2,00 Å), PHE 518 (2,65 Å), SER 530 (2,98 Å), ILE 345 (3,01 Å).	SER 530 (2,85 Å)	5
31	Sissotrin	MET 522 (2,00 Å), SER 530 (2,51 Å).	SER 353 (3,01 Å), SER 530 (2,85 Å), MET 522 (3,39 Å).	5
32	Genistin	MET 522 (1,80 Å), MET 522 (2,12 Å), GLY 526 (2,28 Å), TYR 385 (2,22 Å), SER 530 (2,24 Å).	SER 353 (3,03 Å)	6
33	Ononin	GLY 526 (1,97 Å), VAL 523 (1,91 Å).	MET 522 (3,40 Å)	3

Tabel 4.3 di atas merupakan residu asam amino yang berperan dalam interaksi ikatan hidrogen pada protein target ID: 6COX. Dari data asam amino pembentuk ikatan hidrogen tersebut, dibuatlah diagram untuk mengetahui asam amino yang berperan dalam terbentuknya interaksi ikatan hidrogen pada senyawa uji yang

ditandai dengan jumlah kemunculan asam amino paling sering maupun jarak ikatan paling kecil.



Gambar 4. 4 Diagram jumlah ikatan hidrogen

Berdasarkan diagram 4.4 terdapat 17 asam amino pembentuk ikatan hidrogen. Serin (SER) 353 merupakan asam amino yang paling banyak berkontribusi membentuk ikatan hidrogen antara ligand dan protein ID: 6COX yaitu sejumlah 29 interaksi, disusul oleh TYR 385 sebanyak 23 interaksi dan SER 530 atau GLN 192 sejumlah 18 interaksi.

Rowlinson *et al.*, (2003) menguji keumuman mode pengikatan dengan menganalisis dari inhibitor COX terhadap mutan yang diarahkan ke daerah siklooksigenase-2 (COX-2) pada ARG 120, TYR 355, TYR 385, dan SER 530. Hasilnya menunjukkan Natrium Diklofenak yang berikatan dengan protein *Murin* COX-2 membentuk dua ikatan hidrogen yang kuat pada TYR 385 dan SER 530. Berdasarkan penelitian Alagumuthu *et al.*, (2015) Aktivitas Penghambatan COX-2 (ID: 6COX) oleh senyawa-senyawa derivat Isoquinolin disumbangkan oleh ikatan hidrogen yang dibentuk oleh asam amino ARG 120 dan TYR 385 sehingga menghasilkan peningkatan energi bebas.

Meenambiga *et al.*, (2015) meneliti jamur *Inonotus* sp. terhadap aktivitas inhibitor COX-2 menggunakan protein ID: 6COX. Penelitian tersebut menunjukkan residu asam amino yang membentuk ikatan hidrogen adalah HIS 90, LEU 352, SER 353, TRP 387, dan GLY 526. Residu ini berada di daerah situs aktif enzim COX-2. Penelitian dari (Santoso & Surakarta, 2017) menyebutkan senyawa 4-[(Z)-N-(4-Hidroksifenil) Carboksimidoil]-2 Metoksifenol sebagai inhibitor COX-2 mampu membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino yang berbeda yaitu MET522 dan ARG120 pada sisi aktif COX-2 (kode protein ID: 6COX).

Berdasarkan penelitian Yanuar dkk., (2014) Beberapa senyawa turunan Kuinazolinon yang ditambatkan pada COX-2 dengan kode ID: 6COX. Diantaranya memiliki ikatan hidrogen paling kuat karena berikatan dengan residu ARG 513, TYR 385 dan SER 353 yang memiliki presentase *occupancy* di atas 90% (ikatan hidrogen sangat kuat). Penelitian oleh Yadav *et al.*, (2018) menyebutkan senyawa 2, 3-Dimethylmaleic Anhydride cocok dengan situs aktif siklooksigenase COX-2 yang menampilkan interaksi ikatan hidrogen dengan TYR 385 (A) dan SER 530 (A). Senyawa tersebut sangat mirip dengan mode pengikatan Aspirin yang berikatan hidrogen dengan TYR 385 dalam enzim COX yang menunjukkan bahwa ia mungkin memiliki anti-inflamasi.

Dari beberapa penelitian di atas, residu asam amino yang menstabilkan dan berada pada sisi aktif protein ID: 6COX dengan membentuk ikatan hidrogen yaitu TYR 385, SER 535, ARG 120, SER 530, MET 522 dan ARG 513. Data tersebut mendukung hasil penelitian ini yang menyebutkan asam amino dengan jumlah interaksi ikatan hidrogen terbanyak berasal dari residu SER 535 (29 interaksi), TYR 385 (23 interaksi) dan SER 530 (18 interaksi). Ketiga asam amino tersebut berperan dalam terbentuknya ikatan hidrogen yang berada pada sisi aktif protein. Bahkan menurut Yanuar dkk., (2014) SER 535 dan TYR 385 memiliki sifat ikatan hidrogen yang kuat sehingga menghasilkan efek penghambatan yang maksimal pada protein. Kemungkinan dua residu asam

amino yang membentuk interaksi ikatan hidrogen tersebut berperan dalam kuatnya aktivitas penghambatan ligand pada protein COX-2.

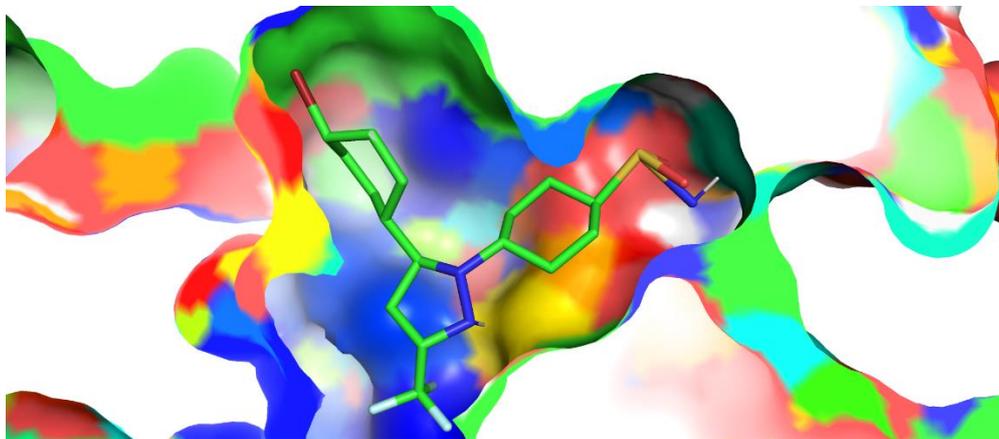
Namun jika dianalisis jenis ikatan berdasarkan urutan *docking* dimana native ligand SC-558 sebagai urutan terbaik menghambat protein ID: 6COX dan disusul oleh senyawa pembanding Celecoxib tidak ditemukannya asam amino SER 535 dan TYR 385. Hanyalah asam amino ARG 120 pembentuk ikatan hidrogen yang paling banyak muncul pada senyawa dengan urutan *docking* terbaik yaitu native ligand SC-558, senyawa Celecoxib dan senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate. Menurut penelitian Alagumuthu *et al.*, (2015) residu ARG 120 pada senyawa yang ditambahkan dengan protein ID: 6COX juga berperan dalam terbentuknya aktivitas biologis penghambatan COX-2.

Selain jenis residu asam amino yang terlibat, jarak ikatan hidrogen yang terbentuk juga berpengaruh terhadap nilai *binding affinity* (kemampuan suatu senyawa mengikat protein target). Jika dibandingkan residu asam amino ARG 120 pada native ligand SC-558 yaitu ARG 120 (2,09 Å) ARG 120 (2,25 Å) dengan residu asam amino ARG 120 dari senyawa pembanding Celecoxib berupa ARG 120 (2,12 Å) ARG 120 (2,50 Å). Terlihat jarak interaksi asam amino ARG 120 pada native ligand SC-558 lebih pendek dibandingkan pada Celecoxib. Hal tersebut dikarenakan semakin kecil jarak ikatan hidrogen yang terbentuk akan membuat ikatan hidrogen tersebut semakin kuat dan lebih stabil berikatan dengan protein, sehingga senyawa SC-558 menghasilkan aktivitas penghambatan COX-2 yang lebih baik.

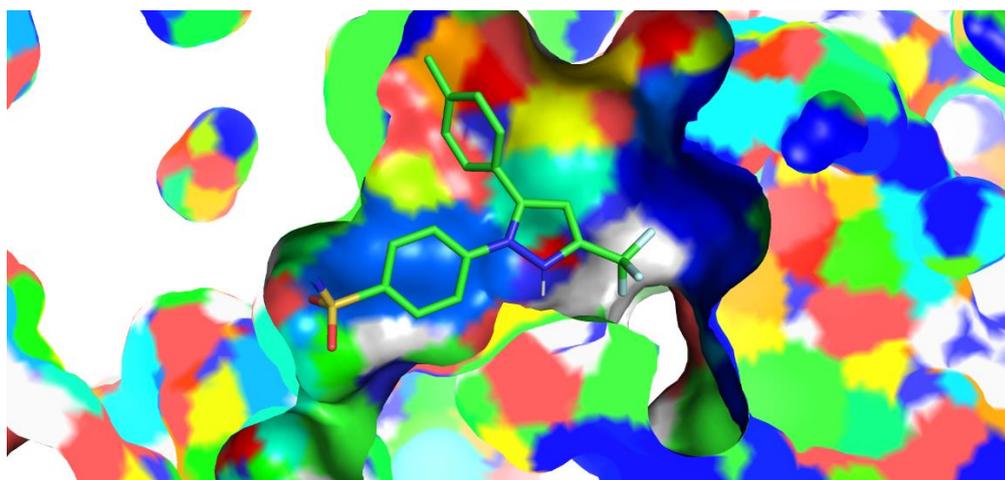
Interaksi residu asam amino yang menimbulkan ikatan hidrogen dengan melibatkan GLN 192 tersebar pada 15 senyawa *docking* teratas dalam penelitian ini. Residu asam amino GLN 192 juga dibuktikan membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif protein target berdasarkan penelitian El-Araby *et al.*, (2012) yang menguji desain dan sintesis turunan senyawa 2,4-Diaryl-5-4H-imidazolone pada protein target ID: 6COX sebagai anti-inflamasi.

### 4.3 Visualisasi Hasil Penambatan Molekul pada Protein ID: 6COX

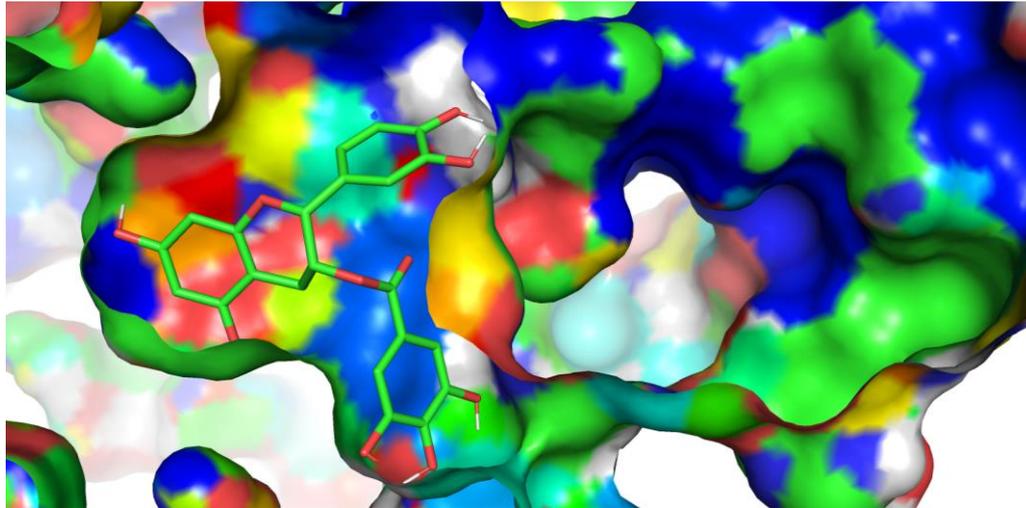
Visualisasi grafis dapat menampilkan gambaran 3D interaksi protein target dengan senyawa uji. Senyawa dengan nilai *docking* teratas yaitu native ligand SC-558, senyawa pembanding Celecoxib dan tiga senyawa uji berupa Epicatechin-3-O-Gallate, Gallocatechin serta Tamarixetin membentuk konformasi terbaik pada sisi aktif protein ID: 6COX. Konformasi senyawa uji yang terikat pada sisi aktif tersebut yang menyebabkan terbentuknya aktivitas biologis penghambatan COX-2.



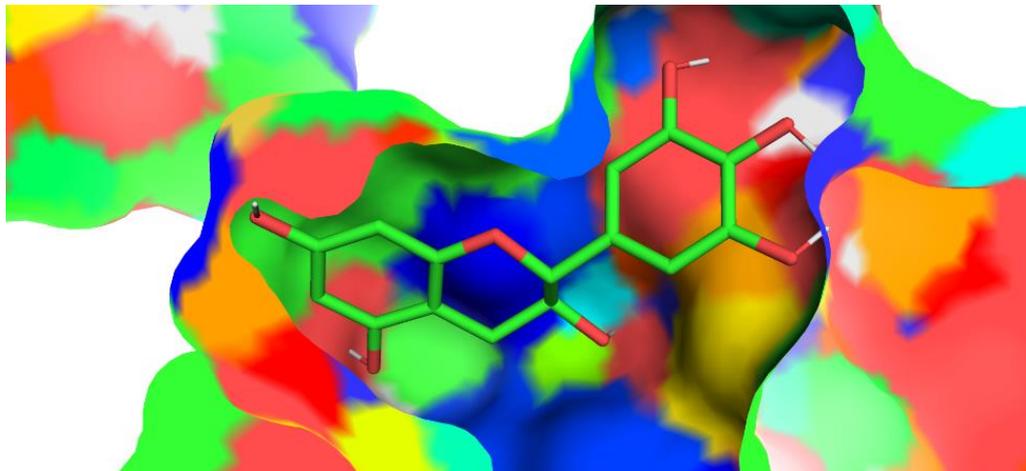
Gambar 4. 5 Konformasi native ligand SC-558 pada sisi aktif protein ID: 6COX menggunakan PyMol



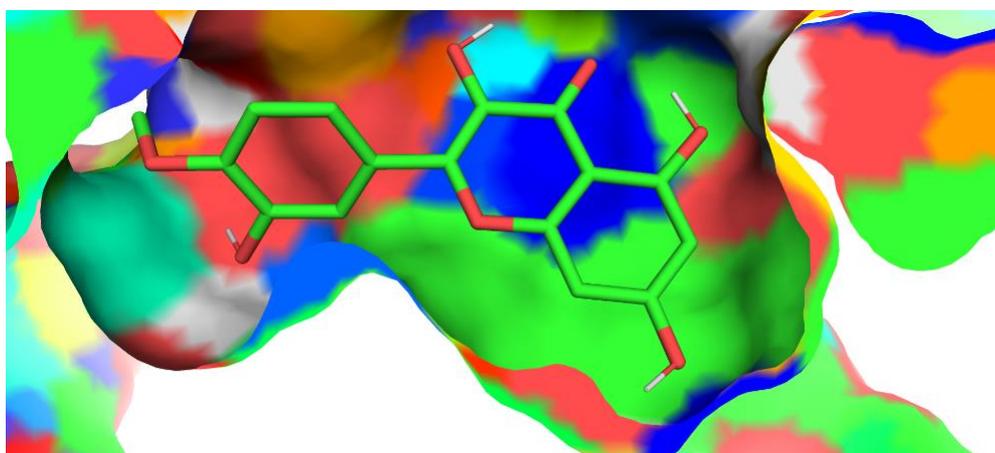
Gambar 4. 6 Konformasi senyawa pembanding Celecoxib pada sisi aktif protein ID: 6COX menggunakan PyMol



Gambar 4. 7 Konformasi ligand Epicatechin-3-O-Gallate pada sisi aktif protein ID: 6COX menggunakan PyMol



Gambar 4. 8 Konformasi ligand Gallocatechin pada sisi aktif protein ID: 6COX menggunakan PyMol



Gambar 4. 9 Konformasi ligand Tamarixetin pada sisi aktif protein ID: 6COX menggunakan PyMol

#### 4.4 *Lipinski Rule of Five*

Aturan Lipinski digunakan untuk memprediksi bioavailabilitas atau kemampuan suatu senyawa dapat diserap dan beredar dalam tubuh jika diberikan secara oral. Senyawa dianggap berpotensi di absorpsi (diserap) dengan baik dan permeabilitas (kemampuan menembus membran sel) tinggi jika memenuhi aturan Lipinski.

Parameter Lipinski hanya dapat dilanggar sebanyak satu aturan saja karena masih dapat diprediksi senyawa tersebut cukup bagus absorpsi dan permeabilitasnya. Parameter Lipinski yang digunakan yaitu bobot molekul harus kurang dari 500 Dalton, donor hidrogen kurang dari 5, akseptor hidrogen kurang dari 10, LogP kurang dari 5 dan refraksi molar 40-130. Berdasarkan hasil *screening Lipinski rule*, terdapat beberapa senyawa yang melanggar lebih dari satu aturan seperti senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate, Phlorizin, Guaijaverin, Sissotrin dan Genistin. Keseluruhan senyawa yang tidak memenuhi uji Lipinski tersebut dikarenakan nilai donor hidrogen dan akseptor hidrogennya terlalu tinggi. Sedangkan senyawa uji lainnya seperti Gallocatechin, Tamarixetin dan lain-lain telah memenuhi uji *Lipinski rules*.

Tabel 4. 3 Hasil *screening lipinski rule of five*

No	Senyawa	Bobot Molekul	Donor Hidrogen	Akseptor Hidrogen	Lipofilisitas	Refraksi molar	Keterangan
1	SC-558	446	3	3	4,658499	92,0431	Memenuhi
2	Celecoxib	382	3	3	4,99952	91,2821	Memenuhi
3	Epicatechin-3-O-Gallate	442	7	10	2,5276	107,256	Memenuhi
4	Gallocatechin	306	6	7	1,2517	74,28777	Memenuhi
5	Tamarixetin	316	4	7	2,3139	78,93768	Memenuhi
6	Myricetin	318	6	8	1,7165	75,71528	Memenuhi
7	Leucocyanidin	306	6	7	1,037	73,87877	Memenuhi
8	Isorhamnetin	316	4	7	2,3139	78,93768	Memenuhi
9	Cyanidin	287	5	6	2,718889	73,71998	Memenuhi
10	Phlorizin	436	7	10	-0,2024	104,925	Memenuhi Tidak
11	Guajaverin	434	7	11	-0,0915	100,2671	Memenuhi
12	Catechin	290	5	6	1,5461	72,62298	Memenuhi
13	Quercetin	302	5	7	2,0109	74,05048	Memenuhi
14	Delphinidin	303	6	7	2,42449	75,38477	Memenuhi
15	Formononetin	268	1	4	3,016999	74,03629	Memenuhi
16	Naringenin	272	3	5	2,509899	70,19488	Memenuhi
17	Epicatechin	290	5	6	1,5461	72,62298	Memenuhi
18	Apigenin	270	3	5	2,419599	70,81388	Memenuhi
19	Phloretin	274	4	5	2,324499	72,19468	Memenuhi
20	Gossypetin	318	6	8	1,7165	75,71527	Memenuhi
21	Biochanin A	284	2	5	2,722599	75,70108	Memenuhi
22	Genistein	270	3	5	2,419599	70,81388	Memenuhi
23	Morin	302	5	7	2,0109	74,05048	Memenuhi
24	Kaempferol	286	4	6	2,305299	72,38568	Memenuhi
25	Isoformononetin	268	1	4	3,016999	74,03628	Memenuhi
26	Daidzein	254	2	4	2,713999	69,14909	Memenuhi
27	Esculin	340	5	9	-1,4969	77,17097	Memenuhi
28	Glycitein	284	2	5	2,722599	75,70108	Memenuhi
29	Prunetin	284	2	5	2,722599	75,70108	Memenuhi
30	Daidzin	416	5	9	0,1871	101,8795	Memenuhi Tidak
31	Sissotrin	446	5	10	0,1957	108,4315	Memenuhi Tidak
32	Genistin	432	6	10	-0,1073	103,5443	Memenuhi
33	Ononin	430	4	9	0,4901	106,7667	Memenuhi

Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen mendeskripsikan semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi (La Kilo *et al.*, 2019). Lebih dari sekitar sepuluh ikatan hidrogen dalam obat tidak baik karena obat akan kesulitan masuk melalui dinding usus ke dalam darah. Obat yang diberikan melalui mulut (obat yang aktif secara oral) harus dikeluarkan dari dalam saluran usus melalui dinding usus

untuk mencapai aliran darah (Christopher Andrew Lipinski, 2002). Berdasarkan tabel 4.4 diatas, lima senyawa yang melanggar aturan Lipinski dikarenakan donor dan akseptor hidrogennya terlalu tinggi akan kesulitan menembus dinding usus sehingga sulit untuk diabsorpsi, bahkan perlu energi yang banyak untuk senyawa tersebut dapat diserap oleh usus dan masuk kedalam pembuluh darah untuk diedarkan. Jika senyawa tersebut lama berada di dalam usus sehingga terakumulasi di dalamnya akan menyebabkan efek toksik pada tubuh.

#### **4.5 Prediksi ADMET**

Proses dalam penemuan obat baru tidak hanya melihat kekuatan ikatan ligand pada protein target, namun juga dievaluasi dari segi farmakokinetik dan toksisitas untuk menentukan tingkat efektifitas dan keberhasilan terapeutiknya. Proses farmakokinetik atau perjalanan obat dalam tubuh di mulai dari Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi (ADME). *Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic Properties Using Graph-Based Signatures* atau pkCSM merupakan situs yang menyajikan prediksi sifat ADMET pada senyawa kimia baru dengan tingkat akurasi yang tinggi.

##### **4.5.1 Absorpsi**

Terdapat beberapa parameter absorpsi yang dapat digunakan untuk mengevaluasi penyerapan suatu obat dalam tubuh yaitu permeabilitas pada Caco, absorpsi pada usus manusia, dan permeabilitas senyawa pada kulit.

Tabel 4. 4 Hasil prediksi absorpsi menggunakan pkCSM

No	Senyawa	Absorpsi					
		Permeabilitas pada Caco2	Ket.	Absorpsi pada usus manusia	Ket.	Permeabilitas pada kulit	Ket.
1	SC-558	0,829	Permeabilitas rendah	86.276	Absorpsi baik	-2,86	Permeabilitas tinggi
2	Celecoxib	0,968	Permeabilitas tinggi	90.155	Absorpsi baik	-2.851	Permeabilitas tinggi
3	Epicatechin-3-O-gallate	-1.807	Permeabilitas rendah	63.139	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
4	Gallocatechin	-0,597	Permeabilitas rendah	58.153	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
5	Tamarixetin	-0,507	Permeabilitas rendah	72.710	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
6	Myricetin	-0,904	Permeabilitas rendah	61.217	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
7	Leucocyanidin	-0,541	Permeabilitas rendah	63.627	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
8	Isorhamnetin	-0,518	Permeabilitas rendah	72.836	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
9	Cyanidin	-0,125	Permeabilitas rendah	70.381	Absorpsi baik	-2,94	Permeabilitas tinggi
10	Phlorizin	0,065	Permeabilitas rendah	42.154	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
11	Guaijaverin	-1.418	Permeabilitas rendah	53.786	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
12	Catechin	-0,462	Permeabilitas rendah	68.734	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
13	Quercetin	-0,725	Permeabilitas rendah	73.295	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
14	Delphinidin	-0,539	Permeabilitas rendah	62.319	Absorpsi baik	-2,75	Permeabilitas tinggi
15	Formononetin	1.246	Permeabilitas tinggi	96.677	Absorpsi baik	-2.775	Permeabilitas tinggi
16	Naringenin	1.031	Permeabilitas tinggi	91.246	Absorpsi baik	-2.752	Permeabilitas tinggi
17	Epicatechin	-0,462	Permeabilitas rendah	68.456	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
18	Apigenin	1.059	Permeabilitas tinggi	92.147	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
19	Phloretin	-0,365	Permeabilitas rendah	70.445	Absorpsi baik	-2.736	Permeabilitas tinggi
20	Gossypetin	-0,937	Permeabilitas rendah	63.955	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
21	Biochanin A	1.127	Permeabilitas tinggi	95.662	Absorpsi baik	-2.755	Permeabilitas tinggi
22	Genistein	1.206	Permeabilitas tinggi	93.894	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
23	Morin	-0,776	Permeabilitas rendah	68.424	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
24	Kaempferol	-0,343	Permeabilitas rendah	80.497	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
25	Isoformononetin	1.251	Permeabilitas tinggi	95.965	Absorpsi baik	-2.783	Permeabilitas tinggi

No	Senyawa	Absorpsi					
		Permeabilitas pada Caco2	Ket.	Absorpsi pada usus manusia	Ket.	Permeabilitas pada kulit	Ket.
26	Daidzein	1.172	Permeabilitas tinggi	94.908	Absorpsi baik	-2,74	Permeabilitas tinggi
27	Esculin	0,428	Permeabilitas rendah	58.581	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
28	Glycitein	1.236	Permeabilitas tinggi	94.913	Absorpsi baik	-2,74	Permeabilitas tinggi
29	Prunetin	1.278	Permeabilitas tinggi	93.404	Absorpsi baik	-2.769	Permeabilitas tinggi
30	Daidzin	0,197	Permeabilitas rendah	52.781	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
31	Sissotrin	0,139	Permeabilitas rendah	54.783	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
32	Genistin	0,103	Permeabilitas rendah	53.405	Absorpsi baik	-2.735	Permeabilitas tinggi
33	Ononin	0,213	Permeabilitas rendah	54.041	Absorpsi baik	-2.737	Permeabilitas tinggi

Sel Caco-2 (*Human colon adenocarcinoma*) merupakan *cell monolayer permeability* dalam ekperimental uji *in vitro* biasanya digunakan untuk memprediksi penyerapan suatu obat yang diberikan melalui oral. Sel Caco-2 berasal dari mukosa usus manusia. Berdasarkan prediksi menggunakan pkCSM, permeabilitas suatu senyawa pada sel Caco-2 dikatakan tinggi bila nilainya  $> 0,90 \log P_{app}$  in  $10^{-6}$  cm/s (Pires *et al.*, 2015b). Dari data di atas senyawa yang memiliki permeabilitas tinggi pada sel Caco-2 yaitu Celecoxib, Formononetin, Naringenin, Apigenin, Biochanin A, Genistein, Isoformononetin, Daidzein, Glycitein dan Prunetin. Tingkat permeabilitas yang tinggi menandakan obat tersebut mampu menembus membran sel epitel usus manusia dengan baik. Sedangkan senyawa uji berupa Epicatechin-3-O-Gallate, Galocatechin, Tamarixetin dan yang lainnya memiliki permeabilitas yang rendah, sehingga diprediksi kemampuan menembus membran sel ususnya tidak maksimal dan dapat menyebabkan dosis terapeutik sedikit berkurang.

Absorpsi pada usus manusia atau *Human Intestinal Absorption* (HIA) merupakan presentase atau jumlah obat yang dapat terabsorpsi pada usus

manusia. HIA merupakan jumlah dari bioavailabilitas dan absorpsi suatu obat yang dievaluasi dari rasio ekskresi melalui urin, empedu, dan feses (Nursamsiar dkk., 2016). HIA berperan penting dalam menjaga ketersediaan hayati suatu obat agar sampai ketempat targetnya. Kemampuan senyawa diabsorpsi buruk jika persentase HIA  $< 30\%$  (Pires *et al.*, 2015b). Senyawa dengan persentase HIA rentang 70-100% diabsorpsi baik oleh tubuh. Secara keseluruhan data persentase HIA dari semua senyawa yang ditambahkan memiliki persentase absorpsi yang bagus, artinya seluruh senyawa dapat diserap baik oleh usus manusia.

Permeabilitas pada kulit atau *skin permeability* digunakan untuk memprediksi suatu senyawa apakah dapat mampu menembus membran kulit dan dapat dibuat sediaan transdermal. Kemampuan permeabilitas kulit yang rendah jika nilai  $\log K_p > -2,5$  (Pires *et al.*, 2015b). Dari data di atas, seluruh senyawa yang telah ditambahkan memiliki permeabilitas atau kemampuan suatu senyawa menembus membran kulit yang tinggi dengan nilai  $\log K_p > -2,5$  dan cocok untuk dibuat sediaan topikal dengan sistem penghantaran transdermal.

#### **4.5.2 Distribusi**

Prediksi distribusi dilakukan untuk mengetahui kemana saja target obat akan disalurkan pada bagian tubuh. Volume distribusi manusia, permeabilitas sawar darah otak dan permeabilitas sistem syaraf pusat merupakan beberapa prediksi yang ditawarkan oleh situs pkCSM yang berpengaruh penting terhadap pendistribusian obat dalam tubuh.

Tabel 4. 5 Hasil prediksi distribusi menggunakan pkCSM

No	Senyawa	Distribusi					
		$VD_{ss}$ (human)	Ket.	$BBB$ permeability	Ket.	$CNS$ permeability	Ket.
1	SC-558	-0,278	Rendah	-0,567	Bagus	-2.019	Buruk
2	Celecoxib	-0,183	Rendah	-0,403	Bagus	-2.078	Buruk
3	Epicatechin-3-O-gallate	0,683	Tinggi	-1.992	Buruk	-3.734	Buruk
4	Gallocatechin	0,999	Tinggi	-1,57	Buruk	-3.514	Buruk
5	Tamarixetin	-0,09	Tinggi	-1.294	Buruk	-3.246	Buruk
6	Myricetin	0,806	Tinggi	-1.695	Buruk	-3.530	Buruk
7	Leucocyanidin	0,885	Tinggi	-1.393	Buruk	-3.568	Buruk
8	Isorhamnetin	-0,076	Tinggi	-1.238	Buruk	-3.246	Buruk
9	Cyanidin	-0,28	Rendah	-1.257	Buruk	-3.834	Buruk
10	Phlorizin	0,899	Tinggi	-1,42	Buruk	-4.098	Buruk
11	Guaijaverin	1.136	Tinggi	-1.681	Buruk	-4.223	Buruk
12	Catechin	0,656	Tinggi	-1.204	Buruk	-3.352	Buruk
13	Quercetin	0,639	Tinggi	-1,5	Buruk	-3.359	Buruk
14	Delphinidin	-0,042	Tinggi	-1.697	Buruk	-3.905	Buruk
15	Formononetin	0,029	Tinggi	0,199	Bagus	-1.976	Buruk
16	Naringenin	0,111	Tinggi	-0,797	Bagus	-2.297	Buruk
17	Epicatechin	0,802	Tinggi	-1,2	Buruk	-3.283	Buruk
18	Apigenin	0,13	Tinggi	-0,872	Bagus	-2.212	Buruk
19	Phloretin	0,251	Tinggi	-1.027	Buruk	-2.502	Buruk
20	Gossypetin	1.069	Tinggi	-1.749	Buruk	-3,51	Buruk
21	Biochanin A	-0,142	Rendah	-0,283	Bagus	-2.223	Buruk
22	Genistein	0,042	Tinggi	-0,835	Bagus	-2.229	Buruk
23	Morin	0,571	Tinggi	-1.335	Buruk	-3.299	Buruk
24	Kaempferol	0,452	Tinggi	-1.161	Buruk	-2.415	Buruk
25	Isoformononetin	-0,115	Tinggi	0,207	Bagus	-1.956	Buruk
26	Daidzein	0,051	Tinggi	0,165	Bagus	-1.982	Buruk
27	Esculin	0,923	Tinggi	-1.131	Buruk	-3.698	Buruk
28	Glycitein	0,037	Tinggi	-0,071	Bagus	-2.135	Buruk
29	Prunetin	-0,179	Rendah	-0,155	Bagus	-2.135	Buruk
30	Daidzin	0,123	Tinggi	-1.243	Buruk	-3.744	Buruk
31	Sissotrin	-0,294	Rendah	-1.429	Buruk	-3.865	Buruk
32	Genistin	0,653	Tinggi	-1.484	Buruk	-3.918	Buruk
33	Ononin	-0,49	Rendah	-1.294	Buruk	-3.692	Buruk

Volume distribusi manusia pada keadaan tunak atau *the steady state volume of distribution* ( $VD_{ss}$ ) menunjukkan volume distribusi dalam keadaan tunak (seberapa banyak obat terdistribusi dalam jaringan dibandingkan dalam plasma). Berdasarkan parameter dari pkCSM nilai

Log  $VD_{ss} > 0,45$  menunjukkan konsentrasi obat lebih tinggi terdistribusi dalam jaringan dibandingkan dalam plasma. Jika nilai Log  $VD_{ss} < -0,15$  menandakan konsentrasi obat lebih rendah terdistribusi dalam jaringan dibandingkan dalam plasma (Pires *et al.*, 2015b).

SC-558, Celecoxib, Cyanidin, Prunetin, Sissotrin, Ononin, dan Biochanin A memiliki  $VD_{ss}$  yang rendah ( $< -0,15$ ) dan senyawa lainnya yang memiliki  $VD_{ss} > -0,15$ . Nilai tersebut menunjukkan obat dapat didistribusikan dengan baik dan sebanding konsentrasinya didalam jaringan maupun dalam plasma (Pashaa *et al.*, 2021; Yeni *et al.*, 2018). Nilai  $VD_{ss}$  yang tinggi juga menunjukkan kandungan senyawa tersebut lebih besar terdistribusi dalam jaringan dibandingkan dalam plasma seperti senyawa uji berupa Epicatechin-3-O-Gallate, Galocatechin, Tamarixetin dan lain-lain. Menurut Lombardo & Jing, (2016) tidak ada jaminan bahwa suatu senyawa akan mencapai tempat kerja dan aktif secara farmakologis atau tidak, berdasarkan  $VD_{ss}$ -nya. Dengan kata lain nilai  $VD_{ss}$  tinggi tidak berarti baik dan nilai rendah tidak berarti buruk. Selanjutnya,  $VD_{ss}$  sangat ditentukan oleh sifat fisikokimia, seperti yang ditunjukkan berulang kali oleh *in vitro* dan model *in silico*. Modifikasi struktural dapat diterapkan untuk meningkatkan atau menurunkan  $VD_{ss}$ .

*Blood Brain Barrier* (BBB) atau sawar darah otak merupakan sistem pelindung yang terdiri dari sel-sel endotel rapat untuk menyaring zat-zat tertentu masuk dari darah ke dalam otak (Chlebek *et al.*, 2019). BBB juga dapat digunakan sebagai parameter membantu pengurangan efek samping dan toksisitas atau meningkatkan kemanjuran farmakologis suatu obat yang didesain targetnya ke dalam otak. Senyawa yang memiliki  $\log BB > 0,3$  dianggap terdistribusi baik atau dapat melewati membran sawar darah otak. Sedangkan senyawa dengan  $\log BB < -1$  tidak terdistribusi baik ke dalam sawar darah otak (Pires *et al.*, 2015b). Beberapa senyawa seperti SC-558, Celecoxib, Formononetin,

Naringenin, Apigenin, Biochanin A, Daidzein, Glycitein, Genistein, Isoformononetin, dan Prunetin memiliki nilai Log BB >-1 yang artinya senyawa ini dapat terdistribusi melewati membran sawar darah otak dan dapat menjadi salah satu kandidat yang ditargetkan pengobatannya pada otak. Sedangkan senyawa uji seperti Epicatechin-3-O-Gallate, Galocatechin dan Tamarixetin memiliki nilai Log BB <-1 dapat dikatakan bahwa senyawa tersebut memiliki kemampuan menembus sawar darah otak yang buruk. Terdapat beberapa hal yang mempengaruhi senyawa bisa melewati BBB. Umumnya molekul yang larut dalam lipid mampu menembus BBB dengan mudah melalui membran sel lipid. Sedangkan molekul hidrofilik agak sulit melintasi barrier dan perlu transportasi media khusus untuk membawanya melintasi barrier (Chlebek *et al.*, 2019).

Sistem Syaraf Pusat (SSP) atau *Central Nervous System* (CNS). Permeabilitas SSP yaitu kemampuan obat untuk dapat menembus SSP juga penting dalam penilaian obat yang ditargetkan pada SSP. Log PS menyatakan permeabilitas SSP jika Senyawa dengan log PS > -2 dapat menembus SSP (bagus). Sedangkan senyawa dengan log PS < -3 dianggap tidak dapat menembus SSP (Pires *et al.*, 2015b). Dari table 4.7 dapat di lihat bahwa seluruh senyawa termasuk Epicatechin-3-O-Gallate, Galocatechin dan Tamarixetin memiliki Log PS < -3 artinya senyawa ini tidak dapat menembus SSP dan tidak dimungkinkan memiliki potensi sebagai kandidat obat dengan target ke SSP. Obat yang tidak aktif SSP menunjukkan situasi yang lebih kompleks dan beberapa sama sekali tidak dapat menembus SSP (Garg & Verma, 2006).

### 4.5.3 Metabolisme

Metabolisme obat memiliki salah satu tujuan yaitu membuat obat menjadi semakin polar sehingga mudah dikeluarkan dari tubuh melalui proses reaksi oksidasi (paling sering), reduksi, hidrolisis dan lain-lain. Enzim yang terlibat dalam metabolisme obat banyak terdapat di jaringan terutama di hati yaitu enzim *Cytochrome* P450 (CYP450) (UdayaRaja, 2016). Terdapat sekitar 50 enzim CYP manusia, hanya sejumlah kecil yang terlibat dalam metabolisme obat yaitu isoenzim CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9 dan CYP2C19 (Ward *et al.*, 2009) dan sekitar 90% oksidasi obat dilakukan oleh enam enzim utama tersebut (Bibi, 2008). Obat dapat bertindak sebagai substrat, inhibitor, dan penginduksi metabolisme obat sitokrom utama.

Tabel 4. 6 Hasil prediksi metabolisme menggunakan pkCSM

No	Senyawa	Metabolisme						
		CYP2D6 substrat	CYP3A4 substrat	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor
1	SC-558	Tidak	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak	Tidak
2	Celecoxib	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
3	Epicatechin-3-O-gallate	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
4	Gallocatechin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
5	Tamarixetin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
6	Myricetin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
7	Leucocyanidin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
8	Isorhamnetin	Tidak	Iya	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
9	Cyanidin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
10	Phlorizin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
11	Guaijaverin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
12	Catechin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
13	Quercetin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
14	Delphinidin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
15	Formononetin	Tidak	Iya	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
16	Naringenin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
17	Epicatechin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
18	Apigenin	Tidak	Tidak	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
19	Phloretin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Iya
20	Gossypetin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
21	Biochanin A	Tidak	Tidak	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
22	Genistein	Tidak	Tidak	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
23	Morin	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
24	Kaempferol	Tidak	Tidak	Iya	Tidak	Iya	Tidak	Tidak
25	Isoformononetin	Tidak	Iya	Iya	Iya	Iya	Tidak	Iya
26	Daidzein	Tidak	Iya	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
27	Esculin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
28	Glycitein	Tidak	Iya	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
29	Prunetin	Tidak	Iya	Iya	Iya	Iya	Tidak	Tidak
30	Daidzin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
31	Sissotrin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
32	Genistin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
33	Ononin	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak

Dari data tersebut diketahui dari tiga senyawa uji teratas, senyawa tamarixetin diprediksi dapat menghambat metabolisme yang dilakukan oleh CYP1A2 atau sebagai inhibitor isoform tersebut. Akan tetapi tidak menghambat empat isoform lainnya. CYP1A2 merupakan keluarga

CYP1 dan sebagian besar diekspresikan di hati karena menyumbang sekitar 10% hingga 15% dari total sitokrom hati manusia dan bertanggung jawab untuk metabolisme 10% hingga 15% obat (Vuppalanchi, 2018). Obat yang menghambat CYP1A2 diperkirakan akan meningkatkan konsentrasi obat dalam plasma. Peningkatan konsentrasi obat dalam plasma jika terakumulasi dalam jumlah besar dapat menyebabkan efek toksik. Namun dikarenakan jumlah CYP1A2 lebih sedikit dibandingkan CYP3A4 sehingga penghambatannya tidak terlalu berefek besar dalam proses metabolisme obat. Sedangkan untuk senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate dan Gallocatechin tidak ada menghambat isoform sitokrom P450 yang menunjukkan kedua senyawa tersebut tidak menghambat proses metabolisme obat sehingga mudah diekskresikan.

Berdasarkan senyawa uji dengan tiga nilai *docking* teratas, hanya Epicatechin-3-O-Gallate yang diprediksi sebagai substrat dari enzim CYP3A4. Senyawa tersebut dapat dimetabolisme oleh enzim CYP3A4 dan mudah dikeluarkan. Sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) adalah sitokrom terbesar karena sebagian besar obat dimetabolisme oleh CYP3A4 (Ogu & Maxa, 2000). Sedangkan senyawa uji lainnya seperti Gallocatechin dan Tamarixetin diprediksi bukan sebagai substrat dari enzim CYP3A4 serta CYP2D6, namun dimungkinkan sebagai substrat lain dari sitokrom P450. Sehingga dapat disimpulkan ketiga senyawa utama tersebut dapat dimetabolisme dengan baik oleh sitokrom P450 dan mudah diekskresikan.

#### 4.5.4 Ekskresi

Proses ekskresi suatu senyawa obat diperlukan untuk mengetahui seberapa mudah dan berapa banyak obat yang dikeluarkan dari tubuh agar menghindari efek toksik. Prediksi ekskresi senyawa dapat dilihat dari *Total Clearance* dan *Renal OCT2 substrat*.

Tabel 4. 7 Hasil prediksi ekskresi menggunakan pkCSM

No	Senyawa	Ekskresi	
		Total Clearance	Renal OCT2 substrat
1	SC-558	-0,283	Tidak
2	Celecoxib	0,193	Tidak
3	Epicatechin-3-O-gallate	-0,213	Tidak
4	Gallocatechin	0,268	Tidak
5	Tamarixetin	0,513	Tidak
6	Myricetin	0,384	Tidak
7	Leucocyanidin	-0,045	Tidak
8	Isorhamnetin	0,518	Tidak
9	Cyanidin	0,354	Tidak
10	Phlorizin	0,285	Tidak
11	Guaijaverin	0,456	Tidak
12	Catechin	0,129	Tidak
13	Quercetin	0,437	Tidak
14	Delphinidin	0,307	Tidak
15	Formononetin	0,26	Tidak
16	Naringenin	0,052	Tidak
17	Epicatechin	0,129	Tidak
18	Apigenin	0,578	Tidak
19	Phloretin	0,201	Tidak
20	Gossypetin	0,33	Tidak
21	Biochanin A	0,279	Tidak
22	Genistein	0,232	Tidak
23	Morin	0,486	Tidak
24	Kaempferol	0,492	Tidak
25	Isoformononetin	0,282	Tidak
26	Daidzein	0,213	Tidak
27	Esculin	0,66	Tidak
28	Glycitein	0,202	Tidak
29	Prunetin	0,301	Tidak
30	Daidzin	0,12	Tidak
31	Sissotrin	0,208	Tidak
32	Genistin	0,14	Tidak
33	Ononin	0,188	Tidak

*Total Clearance (CLTOT)* atau klerens total merupakan jumlah pengeluaran obat yang berasal dari *hepatic clearance* (metabolisme di hati dan empedu) dan *renal clearance* (ekskresi melalui ginjal). Klerens total menunjukkan kecepatan ekskresi suatu obat dan penting dalam menentukan tingkat dosis obat dalam mencapai konsentrasi *steady-state* dan bioavailabilitas obat (Pires *et al.*, 2015b). Laju kecepatan klerens yang besar akan menyebabkan obat cepat dikeluarkan dan obat akan lambat dikeluarkan serta dapat menyebabkan toksisitas jika laju kecepatan klerens rendah.

Dari tabel 4.8 total klerens, keseluruhan senyawa memiliki rentang jumlah serta kecepatan ekskresi antara -0,283 dari senyawa SC-558 sampai 0,66 dari senyawa Esculin dalam satuan log mg /kg/hari. Senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate mempunyai kecepatan klerens yang rendah dibandingkan senyawa SC-558 yaitu -0,213 log mg/kg/hari. Sedangkan senyawa uji Gallocatechin dan Tamarixetin mempunyai kecepatan klerens cukup tinggi yaitu log 0,268 dan 0,513 mg/kg/hari. Senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate memiliki jumlah dan kecepatan ekskresi lebih rendah jika dibandingkan dengan Gallocatechin dan Tamarixetin, namun lebih kecil jika dibandingkan senyawa Esculin.

*Renal Organic Cation Transporter 2 (OCT2) substrate* merupakan transpoter pada organ ginjal yang berperan dalam pembersihan atau ekskresi obat-obatan. Senyawa yang termasuk substrat OCT2 dapat menimbulkan interaksi jika diberikan bersamaan dengan inhibitor OCT2 (Pires *et al.*, 2015b). Dari tabel di atas, keseluruhan ligand senyawa uji tidak termasuk substrat OCT2 sehingga meminimalkan kemungkinan terjadi interaksi yang tidak diinginkan.

### 1.5.6 Toksisitas

Terdapat beberapa parameter toksisitas suatu senyawa yang akan dijadikan kandidat obat seperti uji AMES, uji hepatoksisitas, uji

*T.Pyriformis*, uji *Minnow*, uji toksisitas pada kulit, uji penghambatan hERG I & II dan dosis maksimal toleran terhadap manusia.

Tabel 4. 8 Hasil prediksi toksisitas menggunakan pkCSM

No	Senyawa	Toksisitas				<i>Hepatotoxicity</i>
		<i>AMES toxicity</i>	<i>Max. tolerated dose (human)</i>	<i>hERG I inhibitor</i>	<i>hERG II inhibitor</i>	
1	SC-558	Iya	-0,084	Tidak	Ya	Tidak
2	Celecoxib	Iya	-0,021	Tidak	Tidak	Tidak
3	Epicatechin-3-O-gallate	Tidak	0,472	Tidak	Ya	Tidak
4	Gallocatechin	Tidak	0,527	Tidak	Tidak	Tidak
5	Tamarixetin	Tidak	0,476	Tidak	Tidak	Tidak
6	Myricetin	Tidak	0,502	Tidak	Tidak	Tidak
7	Leucocyanidin	Tidak	0,535	Tidak	Tidak	Tidak
8	Isorhamnetin	Tidak	0,526	Tidak	Tidak	Tidak
9	Cyanidin	Tidak	-0,355	Tidak	Tidak	Ya
10	Phlorizin	Tidak	0,454	Tidak	Tidak	Tidak
11	Guaijaverin	Tidak	0,551	Tidak	Ya	Tidak
12	Catechin	Tidak	0,415	Tidak	Tidak	Tidak
13	Quercetin	Tidak	0,55	Tidak	Tidak	Tidak
14	Delphinidin	Tidak	-0,341	Tidak	Tidak	Ya
15	Formononetin	Iya	0,128	Tidak	Ya	Tidak
16	Naringenin	Tidak	-0,309	Tidak	Tidak	Tidak
17	Epicatechin	Tidak	0,406	Tidak	Tidak	Tidak
18	Apigenin	Tidak	0,424	Tidak	Tidak	Tidak
19	Phloretin	Tidak	-0,145	Tidak	Tidak	Tidak
20	Gossypetin	Tidak	0,486	Tidak	Tidak	Tidak
21	Biochanin A	Iya	0,175	Tidak	Tidak	Tidak
22	Genistein	Tidak	0,411	Tidak	Tidak	Tidak
23	Morin	Tidak	0,572	Tidak	Tidak	Tidak
24	Kaempferol	Tidak	0,581	Tidak	Tidak	Tidak
25	Isoformononetin	Iya	0,078	Tidak	Iya	Tidak
26	Daidzein	Iya	0,106	Tidak	Tidak	Tidak
27	Esculin	Tidak	0,308	Tidak	Tidak	Ya
28	Glycitein	Tidak	0,096	Tidak	Iya	Tidak
29	Prunetin	Tidak	0,199	Tidak	Iya	Tidak
30	Daidzin	Tidak	0,584	Tidak	Tidak	Tidak
31	Sissotrin	Tidak	0,512	Tidak	Tidak	Tidak
32	Genistin	Tidak	0,678	Tidak	Iya	Tidak
33	Ononin	Tidak	0,485	Tidak	Tidak	Tidak

Tabel 4. 9 Hasil prediksi toksisitas menggunakan pkCSM

No	Senyawa	Toksistas				
		<i>Skin Sensitisation</i>	<i>T.Pyriiformis toxicity</i>	ket.	<i>Minnow toxicity</i>	ket
1	SC-558	Tidak	1.048	Toksik	0,453	Rendah
2	Celecoxib	Tidak	0,975	Toksik	0,722	Rendah
3	Epicatechin-3-O-gallate	Tidak	0,285	Toksik	5.906	Rendah
4	Gallocatechin	Tidak	0,311	Toksik	5.068	Rendah
5	Tamarixetin	Tidak	0,355	Toksik	3.478	Rendah
6	Myricetin	Tidak	0,286	Toksik	4.519	Rendah
7	Leucocyanidin	Tidak	0,298	Toksik	5.047	Rendah
8	Isorhamnetin	Tidak	0,352	Toksik	3.478	Rendah
9	Cyanidin	Tidak	0,233	Toksik	4.135	Rendah
10	Phlorizin	Tidak	0,285	Toksik	6.218	Rendah
11	Guaijaverin	Tidak	0,285	Toksik	6.342	Rendah
12	Catechin	Tidak	0,421	Toksik	4.233	Rendah
13	Quercetin	Tidak	0,306	Toksik	3.224	Rendah
14	Delphinidin	Tidak	0,277	Toksik	4.828	Rendah
15	Formononetin	Tidak	0,712	Toksik	0,244	Rendah
16	Naringenin	Tidak	0,709	Toksik	2.743	Rendah
17	Epicatechin	Tidak	0,411	Toksik	4.516	Rendah
18	Apigenin	Tidak	0,489	Toksik	1.398	Rendah
19	Phloretin	Tidak	0,534	Toksik	2.904	Rendah
20	Gossypetin	Tidak	0,285	Toksik	4.157	Rendah
21	Biochanin A	Tidak	0,587	Toksik	0,599	Rendah
22	Genistein	Tidak	0,461	Toksik	1.343	Rendah
23	Morin	Tidak	0,3	Toksik	3.869	Rendah
24	Kaempferol	Tidak	0,378	Toksik	2.442	Rendah
25	Isoformononetin	Tidak	0,711	Toksik	0,596	Rendah
26	Daidzein	Tidak	0,503	Toksik	0,988	Rendah
27	Esculin	Tidak	0,287	Toksik	4.459	Rendah
28	Glycitein	Tidak	0,489	Toksik	0,951	Rendah
29	Prunetin	Tidak	0,542	Toksik	1.235	Rendah
30	Daidzin	Tidak	0,286	Toksik	3.142	Rendah
31	Sissotrin	Tidak	0,285	Toksik	3.782	Rendah
32	Genistin	Tidak	0,285	Toksik	4.271	Rendah
33	Ononin	Tidak	0,286	Toksik	2.652	Rendah

Uji Ames merupakan uji untuk mengetahui suatu senyawa bersifat mutagenik (zat yang menyebabkan mutasi) serta karsinogenik (zat yang memiliki sifat penyebab kanker) atau tidak. Uji Ames juga membuktikan 80-90% senyawa yang bersifat karsinogenik juga bersifat mutagenik. Uji ini biasanya dilakukan pada bakteri, secara eksperimental bakteri akan dibuat mutasi karena dinonaktifkan gen pengkode asam amino histidin serta triptopan, kemudian tambahkan sampel senyawa dan apabila gen pengkode histidin dan triptopan aktif (terjadi mutasi balik) oleh penambahan sampel maka sampel bersifat mutagenik (Radji dkk., 2004). Berdasarkan tabel uji prediksi Ames di atas beberapa senyawa seperti SC-558, Celecoxib, Formononetin, Biochanin A, Isoformononetin, dan Daidzein positif pada uji ini. senyawa tersebut diprediksi dapat melakukan mutasi balik sehingga bersifat mutagenik dan memiliki kemungkinan bersifat karsinogenik pada bakteri. Sedangkan senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate, Gallocatechin dan Tamarixetin diprediksi tidak menimbulkan tanda mutasi balik.

Dosis toleransi maksimum atau *Maximum Recommendation Tolerated Dose* (MRTD) merupakan perkiraan ambang batas dosis toksik bahan kimia pada manusia. Uji ini membantu memperkirakan dosis awal maksimum untuk obat-obat dalam uji klinis fase-1. Apabila nilai MRTD < atau sama dengan 0,477 log (mg/kg/hari) maka dosis toleransi masih tergolong rendah. Sedangkan apabila nilai MRTD >0,477 log (mg/kg/hari) dosis toleransinya tinggi (Pires *et al.*, 2015b). uji prediksi yang telah dilakukan menunjukkan senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate dan Tamarixetin memiliki dosis rendah yang masih bisa ditoleransi.

*The human ether-a-go-go-related gene* (hERG) merupakan gen mengkode saluran ion kalium (K<sup>+</sup>) yang berkontribusi pada aktivitas detak jantung. Penghambatan pada (hERG) dikaitkan dengan peningkatan durasi ventrikel dan perpanjangan interval QT yang dapat menyebabkan aritmia dan gagal jantung yang lebih parah (Pires *et al.*, 2015b). Inhibitor

hERG 1 menyebabkan interval QT elektrokardiografi panjang dan aritmia jantung, serta penghentian jantung secara mendadak (Kolbe *et al.*, 2010). Inhibitor hERG 2 menyebabkan peningkatan sekresi insulin jika kadar glukosa tinggi (Zhao & Yang, 2019) dan peningkatan resiko aritmia jantung yang parah (Bagnes *et al.*, 2009). Dari hasil prediksi beberapa senyawa seperti SC-558 dan Epicatechin-3-O-Gallate memiliki kemungkinan sebagai inhibitor hERG 2 yang berpeluang dapat menimbulkan aritmia maupun kegagalan jantung secara mendadak. Sedangkan senyawa uji seperti Gallocatechin dan Tamarixetin diprediksi bukan sebagai inhibitor Inhibitor hERG 1 dan hERG 2 sehingga dimungkinkan cukup aman efeknya pada jantung dalam pengujian ini.

Uji hepatotoksisitas merupakan aspek keamanan yang paling diperhatikan dalam proses pengembangan obat. Toksisitas senyawa dapat menunjukkan satu peristiwa gangguan patologis atau fisiologis hati yang bersifat toksik (Pires *et al.*, 2015b). Berdasarkan uji prediksi hepatotoksik senyawa Cyanidin, Delphinidin, dan Esculin berpeluang memiliki sifat toksik terhadap hati. Sedangkan senyawa uji Epicatechin-3-O-Gallate, Gallocatechin dan Tamarixetin diprediksi tidak memiliki sifat toksik terhadap hati, dalam arti lain senyawa ini tidak mengganggu fungsi fisiologis hati salah satunya yaitu proses metabolisme obat.

Uji sensasi pada kulit untuk mengetahui potensi efek samping pada kulit setelah pemakaian produk apakah senyawa tersebut menimbulkan atau menginduksi efek alergi. Evaluasi ini digunakan untuk mengetahui seberapa aman efek dari senyawa yang digunakan (Pires *et al.*, 2015b). Berdasarkan data di atas, semua senyawa uji tidak menunjukkan potensi menimbulkan iritasi pada kulit.

Uji toksisitas *Tetrahymena pyriformis* digunakan untuk mengetahui titik akhir toksisitas. Penggunaan protozoa *T.pyriformis* digunakan karena metabolisme dalam tubuhnya menyerupai metabolisme mamalia (hewan tinggi) seperti tikus dan uji toksisitas dengan protozoa ini lebih cepat serta hanya diperlukan jumlah yang sedikit untuk pengujian secara eksperimental. Penetapan uji ini menunjukkan nilai  $pIG_{50}$  yaitu logaritma negatif berdasarkan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat 50% pertumbuhan hewan uji protozoa dalam satuan  $\log \mu\text{g} / \text{L}$ . Diprediksi jika nilai  $> -0,5 \log \mu\text{g}/\text{L}$  senyawa tersebut akan dianggap beracun (Pires *et al.*, 2015b). Data di atas diketahui semua senyawa uji memiliki nilai di atas  $-0,5 \log \mu\text{g}/\text{L}$  dan artinya semua senyawa berkemungkinan menimbulkan toksisitas pada protozoa *Tetrahymena pyriformis*.

Toksisitas *Minnow* merupakan salah satu pengujian toksisitas akut yang menganut konsep  $LC_{50}$  yaitu konsentrasi sampel uji yang menyebabkan 50% kematian hewan uji. Toksisitas *Minnow* dilakukan untuk mengetahui suatu senyawa bersifat toksik terhadap lingkungan terutama perairan dengan menggunakan hewan uji ikan *Fathead Minnows* dengan nama latin *Pimephales promelas* sebagai salah satu ikan yang paling sering digunakan untuk uji toksisitas selama 96 jam. Senyawa dengan nilai toksisitas dengan  $\log LC_{50} < -0,3$  tergolong memiliki sifat toksisitas akut yang tinggi (Pires *et al.*, 2015b). Dari data prediksi di atas semua senyawa uji memiliki nilai  $\log LC_{50} > -0,3$  sehingga semua senyawa diprediksi tidak memiliki toksisitas akut yang tinggi pada uji toksisitas pencemaran lingkungan menggunakan hewan uji ikan *Minnow*.

#### 4.6 Keterbatasan Penelitian

Beberapa keterbatasan penelitian dalam studi *in silico* penambatan molekuler (*molecular docking*) yaitu penelitian ini hanya menguji senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam daun jambu biji dan telah melalui *screening* uji *lipinski rules of five*. Sedangkan dalam daun jambu biji terdapat berbagai golongan senyawa lain yang berkemungkinan memiliki aktivitas anti-inflamasi seperti golongan alkaloid, tannin maupun minyak esensial. Keterbatasan lainnya, dalam penelitian ini hanya mencari senyawa uji flavonoid daun jambu biji yang berpotensi inhibitor COX-2 selektif sebagai anti-inflamasi, sedangkan jalur penghambatan pada mediator pro-inflamasi untuk mengurangi inflamasi progresif banyak tersedia. *Software* penambatan molekul tersedia beratus macam jumlahnya dan pada penelitian ini hanya menggunakan *software* Autodock4 karena dalam penggunaannya dapat diakses secara gratis namun tingkat keakuratan serta analisisnya cukup tinggi.