

STUDI *IN SILICO* AKTIVITAS SENYAWA ANTI INFLAMASI ASAM JAWA SEBAGAI INHIBITOR COX-2

Joshua Harry Chandra^{1*}, Aisyah Sadira Azalia², Vita Widinda Lestari³, Syifa Khairani⁴, Annisa Hafizhah Saepudin⁵, Asiyah Noor Hasanah⁶

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia^{1,2,3,4,5,6}

*Corresponding Author : joshua20002@mail.unpad.ac.id

ABSTRAK

Inflamasi sangat dipengaruhi oleh salah satu enzim yang berperan sebagai mediator yaitu COX-2. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui senyawa aktif dari tanaman asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang berperan dalam aktivitas antiinflamasi melalui inhibisi enzim COX-2 dalam uji *in silico* dengan metode penambatan molekuler. Sebelumnya, dilakukan analisis profil farmakokinetika dan toksisitas berdasarkan Lipinski RO5 dan Pre-ADMET. Proses penambatan molekuler dilakukan menggunakan program *AutoDock Tools* 1.5.6 dan divisualisasikan dengan *Biovia Discovery Studio* 2021. Dari 15 senyawa aktif, didapatkan senyawa Luteolin yang menunjukkan kedekatan interaksi asam amino seperti interaksi asam tolfenamat sebagai ligan dari obat standar. Pada penelitian ini, dilakukan juga pengamatan aktivitas farmakologi dari senyawa yang terkandung dalam buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) dengan metode uji toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan subjek uji larva udang. Hasil pengujian toksisitas digunakan untuk melihat potensial suatu senyawa sebagai racun yang ditunjukkan sebagai nilai *Lethal Concentration* 50% (LC50), dan pada metode vial (makroskopik) didapatkan nilai LC50 yang tergolong toksik yaitu sebesar 56,234 ppm.

Kata kunci : anti inflamasi, *brine shrimp lethality test* (BSLT), *lethal concentration* 50% (lc50), penambatan molekuler, *tamarindus indica* l

ABSTRACT

Inflammation is strongly influenced by one of the enzymes that acts as a mediator, namely COX-2. The purpose of this study was to determine the active compound from the tamarind plant (Tamarindus indica L.) which plays a role in anti-inflammatory activity through the inhibition of the COX-2 enzyme in the in silico test with the molecular docking method. Previously, analysis of the pharmacokinetic and toxicity profiles was carried out based on Lipinski RO5 and Pre-ADMET. The molecular docking process was carried out using the AutoDock Tools 1.5.6 program and visualized with Biovia Discovery Studio 2021. Of the 15 active compounds, Luteolin compounds showed close amino acid interactions as the interaction of tolfenamic acid as a ligand of standard drugs. In this study, the pharmacological activity of the compounds contained in tamarind fruit (Tamarindus indica L.) was also observed using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) toxicity test using shrimp larvae as the test subject. The results of the toxicity test are used to see the potential of a compound as a poison which is indicated as a Lethal Concentration value of 50% (LC50), and in the vial method (macroscopic) the LC50 value which is classified as toxic is 56.234 ppm.

Keywords : anti-inflammatory, *brine shrimp lethality test* (BSLT), *lethal concentration* 50% (lc50), *molecular docking*, *tamarindus indica* l

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan suatu keadaan di mana bagian dari respons biologis kompleks jaringan tubuh terhadap rangsangan berbahaya, seperti patogen, sel yang rusak atau iritan dan merupakan respons protektif yang melibatkan sel imun, pembuluh darah, dan mediator molekuler. Inflamasi atau peradangan ini sangat dipengaruhi senyawa yang dihasilkan oleh asam arakidonat. Salah satu enzim yang berperan dalam mediator ini yaitu COX-2 (Suherman M, Prasetiawati R, Ramdani D. 2020). COX merupakan enzim yang penting dalam mengkatalisis pembentukan mediator yang terlibat dalam proses inflamasi. Inhibitor COX

merupakan salah satu pilihan terapi yang bertujuan memodulasi nyeri, peradangan, dan demam. Banyak inhibitor COX-2 yang telah dikembangkan sebagai obat untuk mengatasi radang. Namun, penggunaan jangka panjang obat antiinflamasi telah menunjukkan banyak efek samping seperti gangguan gastrointestinal, ginjal, dan kardiovaskular, hal ini menunjukkan perlunya inhibitor yang bebas dari efek samping (Harirforoosh S, Asghar A, Jamali F. 2013).

Tamarindus indica L. atau yang lebih dikenal dengan tanaman asam jawa merupakan tumbuhan yang sering dijumpai khususnya di negara beriklim tropis termasuk Indonesia. Berdasarkan berbagai penelitian senyawa yang terkandung di dalam daun asam jawa ini banyak mengandung aktivitas inflamasi (Suherman M, Prasetiawati R, Ramdani D. 2020).

Kandungan senyawa bioaktif tumbuhan dapat diketahui dengan pengujian toksisitas, salah satunya menggunakan penelitian awal yakni metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Pengujian tersebut dapat memberikan gambaran potensi dari tingkat toksisitas suatu senyawa tanaman, termasuk tanaman asam jawa dapat juga menggunakan metode BSLT ini (Puspitasari E, Rozirwan, Hendri M. 2018).

Senyawa yang terkandung di dalam tumbuhan asam jawa ini cukup banyak. Salah satunya adalah linalool anthranilate yang diketahui sebagai senyawa alami dari minyak esensial yang memiliki aktivitas antiinflamasi cukup baik sehingga berpotensi untuk berikatan dengan reseptor COX-2. Sebagai salah satu senyawa aktif yang berperan dalam aktivitas antiinflamasi pada tanaman asam jawa, linalool berinteraksi dengan reseptor COX-2 melalui penghambatan COX-2 itu sendiri (Suherman M, Prasetiawati R, Ramdani D. 2020).

Penambatan molekuler (*molecular docking*) telah diketahui sebagai metode yang umum digunakan pada penelitian interaksi antara suatu senyawa dengan protein melalui metode komputisasi dengan tujuan penemuan obat-obatan berbasis struktur. Metode penambatan molekuler dapat menghasilkan studi mengenai kemungkinan atau potensi-potensi mode ikatan serta memprediksi afinitas pengikatan dari penambatan ligand-protein (Prasetio NF, Kepel BJ, Bodhi W, Fatimawali, Manampiring A, Budiarmo F. 2021).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui senyawa aktif dari tanaman asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang berperan dalam aktivitas antiinflamasi melalui inhibisi enzim COX-2 dalam uji *in silico* dengan metode penambatan molekuler.

METODE

Alat-alat yang digunakan berupa alat-alat gelas, timbangan analitik, *water bath*, kotak plastik, gabus, aerator (Amara), dan lampu neon akuarium. Bahan yang digunakan dalam penelitian dengan metode komputasi adalah struktur makromolekul protein reseptor COX-2 yang diperoleh dari web Protein Data Bank pada kode PDB 5IKT dengan resolusi 2,45 Å serta bahan struktur tiga dimensi ligan yang digunakan yaitu asam tolfenamat dan senyawa-senyawa lainnya dari *Tamarindus indica* L. Perangkat lunak dan situs-situs yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah Sistem Operasi Windows 11, ChemDraw Ultra 12.0, Chem3D Pro 12.0, AutoDockTools 1.5.6, BIOVIA Discovery Studio 2021, Pre-ADMET, SwissADME, Protein Data Bank, PubChem, dan DUD-E. Bahan yang digunakan untuk uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) meliputi buah segar *Tamarindus indica* L., aquadest, garam laut, ragi, telur udang, dan metanol.

Prediksi Lipinski Rules of 5

Dicari terlebih dahulu senyawa uji yang akan diujikan pada laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, selanjutnya struktur 2D dan 3D dari senyawa tersebut diunduh dengan format SDF. Lalu, dibuka laman <http://www.swissadme.ch/index.php> dan dimasukkan file struktur 2D yang sudah diunduh sebelumnya. Hasil gambar struktur 2D akan

tampil dengan format JPG. Selanjutnya, *file* struktur 2D dijalankan pada laman SwissADME sampai didapatkan data-data hasil prediksi Lipinski RO5 yang dibutuhkan. Dimasukkan data-data hasil prediksi pada tabel dan dibuka aplikasi Chem3D, lalu dimasukkan file struktur 3D yang sudah diunduh sebelumnya. Hasil gambar struktur 3D yang muncul disimpan dengan format JPG kemudian gambar-gambar struktur senyawa 2D dan 3D dimasukkan ke dalam tabel.

Prediksi ADMET

Pada laman <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/adme/> dipilih menu ADME dan gambar senyawa yang akan diprediksi. Pilih ikon "Save" dan *copy* komponen molekul. Lalu, dipilih "Submit" untuk melihat hasil prediksi ADMET. Data-data prediksi ADMET yang dibutuhkan, dimasukkan ke dalam tabel. Selanjutnya masuk ke menu *Toxicity* dan dipilih ikon "open" lalu *paste* komponen molekul yang sudah disimpan sebelumnya. Data-data prediksi *Toxicity* yang dibutuhkan, dimasukkan ke dalam tabel.

Penambatan Molekuler (*Molecular Docking*)

Protein COX-2 diunduh dengan kode 5IKT pada *Protein Data Bank* <http://www.rcsb.org/>. Dipisahkan protein dengan ligan yang terkandung di dalamnya dengan program SPDB Viewer. Kemudian ditambahkan atom hidrogen dan *kollman charges* untuk memperbaiki struktur molekul protein menggunakan autodock tools. Molekul protein yang telah didapatkan tersebut disimpan dengan format .pdbqt. Kemudian molekul digambar menggunakan program ChemDraw dan dilakukan optimasi molekul menggunakan program Chem3D. Setelah itu, ditambahkan elemen seperti parameter torsi dan Gasteiger charges menggunakan program AutoDockTools dan molekul ligand disimpan dengan format .pdbqt. Kemudian dilakukan penentuan koordinat dan luas area kantung aktif dari ligand tersebut terhadap protein COX-2 (5IKT) menggunakan Grid Box pada program AutoDockTools dan parameter koordinat dan luas area kantung aktif yang telah didapatkan, disimpan dengan format .txt. Proses docking dilakukan menggunakan program AutoDock dengan menjalankannya pada *command prompt* (cmd) kemudian dilakukan validasi dengan re-docking ligand asli dengan protein reseptor lalu dilihat parameter *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Setelah itu, interpretasi hasil dilakukan di software Biovia dari file Complex yang telah dibuat di Autodock. Tahap-tahap docking di atas dilakukan pada tiap senyawa uji dengan preparasi masing-masing ligand yang akan diuji.

Pembuatan Ekstrak Buah Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.)

Buah segar asam jawa dikupas dan dipisahkan biji dengan daging buahnya kemudian daging buah ditimbang, diperoleh sebanyak 193,98 gram. Dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan 1:1 yaitu dilarutkan sekitar 190 mL kemudian dihomogenkan. Lalu dimasukkan dalam waterbath dengan suhu 90°C dan dibiarkan selama 15 menit (infusa). Infusa disaring dengan kain bersih dan didapatkan ekstrak kental.

Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak

Larutan stok sampel 10.000 ppm dibuat dengan memipet 1 mL larutan sampel (hasil penyaringan) dan dimasukkan ke labu ukur 20 mL. Lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas. Setelah itu, dibuat juga larutan stok sampel 1000 ppm dengan memipet 2 mL larutan sampel 10.000 ppm ke dalam labu ukur 20 mL lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas. Kemudian diambil 1,5; 3; 6; 12 mL dari larutan sampel 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 30; 60; 120; 240 ppm. Setelah itu, diambil 2,4; 4,8; 9,6 mL larutan

sampel 10.000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas. Didapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 480; 960; 1920 ppm.

Pembuatan Larutan Medium

Garam laut ditimbang sebanyak 20 gram dan dilarutkan dengan 500 mL aquades dalam gelas beaker dan dihomogenkan. Larutan garam laut disaring kemudian ditambahkan ragi dan dihomogenkan kembali. Larutan garam disimpan dalam wadah yang telah dipasang aerator. Lalu dimasukkan telur udang ke dalam medium garam laut dan dibiarkan terpapar cahaya terang selama 48 jam.

Pengujian BSLT dalam Vial

Sebanyak 21 buah vial diberi label sesuai dengan variasi konsentrasi yang telah dibuat untuk replikasi sebanyak tiga kali dari masing-masing variasi konsentrasi, lalu dimasukkan sebanyak 10-20 larva udang ke dalam masing-masing vial. Ditambahkan 5 mL ekstrak asam jawa ke dalam tiap vial kemudian ditambahkan juga larutan media hingga tanda batas 10 mL. Kemudian dibiarkan selama 24 jam dalam keadaan vial yang terbuka dan terpapar cahaya terang, setelah itu dihitung jumlah larva mati dan larva hidup setelah 24 jam.

Pengujian BSLT dalam *Microplate*

Pada *microplate* dimasukkan 10-20 larva udang dengan menggunakan mikropipet berskala 100 mikrometer. Ditambahkan ekstrak dengan variasi konsentrasi ke dalam *microplate* menggunakan mikropipet. Lalu, dibiarkan pada cahaya terang selama 24 jam dan kemudian dihitung jumlah larva yang mati dengan bantuan mikroskop, selanjutnya ditambahkan metanol ke dalam *microplate* dan dihitung jumlah larva yang terlihat pada mikroskop untuk melihat populasi larva pada tiap lubang *microplate*.

HASIL

Tabel 1. Hasil Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

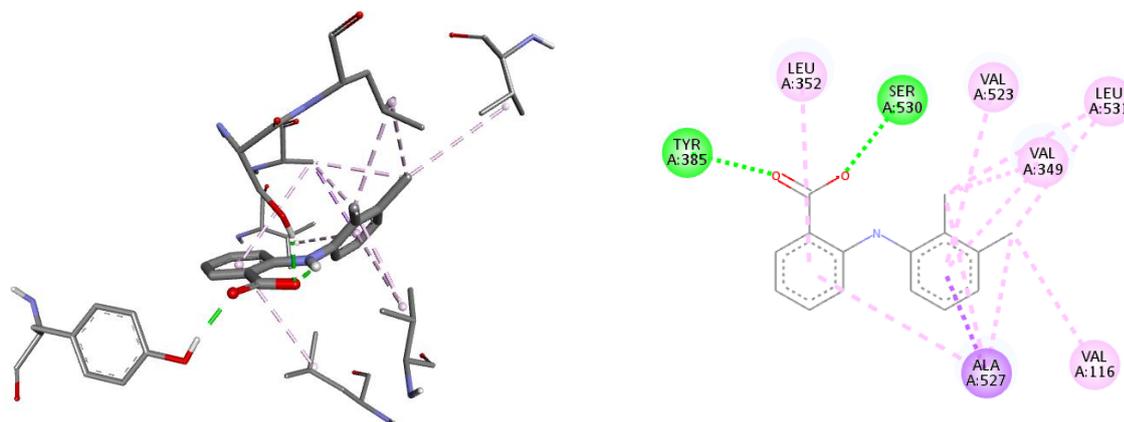
No.	Nama Senyawa	Berat Molekul (g/mol) (< 500 Da)	Log P (<5)	Ikatan Hidrogen		Keterangan
				Donor (<5)	Akseptor (< 10)	
1	Diphenyl-ether	170,21	2,55	0	1	Memenuhi
2	Caryophyllene	204,35	3,29	0	0	Memenuhi
3	Methyl 3,5-ditert-butyl-4-hydroxybenzoate	264,36	3,45	1	3	Memenuhi
4	Phytol	296,53	4,71	1	1	Memenuhi
5	Longifolene	204,35	3,14	0	0	Memenuhi
6	Limonene	136,23	2,72	0	0	Memenuhi
7	Methyl hexadecanoate	270,45	4,41	0	2	Memenuhi
8	Curcumin	368,38	3,27	2	6	Memenuhi
9	10-octadecenoic acid	282,46	4,14	1	2	Memenuhi
10	Linalool anthranilate	273,37	3,37	1	2	Memenuhi
11	Taxifolin	304,25	0,71	5	7	Memenuhi
12	Eriodictyol	288,25	1,62	4	6	Memenuhi
13	Luteolin	286,24	1,86	4	6	Memenuhi
14	(+)-catechin	290,27	1,33	5	6	Memenuhi
15	(-)-epicatechin	290,27	1,47	5	6	Memenuhi
16	Asam tolfenamat (pemanding)	261,70	2,44	2	2	Memenuhi

Kelima belas senyawa tanaman asam jawa dan senyawa obat pembanding memenuhi *Lipinski Rule of Five* (RO5) dimana semua senyawa memiliki berat molekul kurang dari 500 Dalton, tidak memiliki nilai koefisien partisi (logP) yang lebih dari 5, jumlah ikatan hidrogen donor kurang dari 5, serta akseptor ikatan hidrogen yang dimiliki lebih kecil dari 10. Hasil dari pengujian *Lipinski Rule of Five* (RO5) pada lima belas senyawa asam jawa dapat dilihat pada Tabel 1.

Selanjutnya, dilakukan pengujian ADMET pada kelima belas senyawa beserta senyawa pembanding yang dapat diprediksi melalui situs <https://preadmet.bmdrc.kr/>. Parameter uji ini adalah *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan *Caco 2* sebagai parameter absorpsi, *Blood Brain Barrier* (BBB) dan *Plasma Protein Binding* (PPB) sebagai parameter distribusi, serta mutagenisitas dan karsinogenisitas sebagai parameter toksisitas. Hasil pengujian ADMET dapat dilihat dari Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Prediksi ADMET

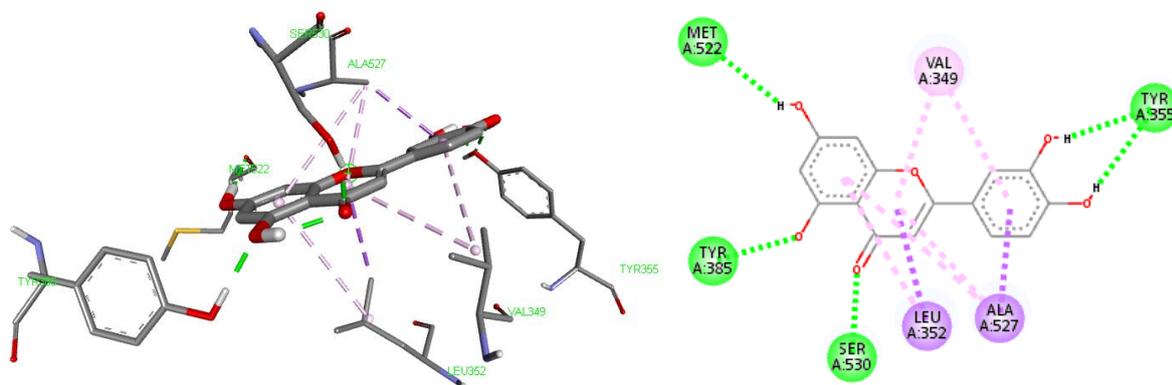
No.	Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksitas	
		HIA (%)	Caco-2 (nm/sec)	PPB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen
1	Diphenyl-ether	100	22,5539	100	1,73296	Mutagen	Positive
2	Caryophyllene	100	13,6362	100	9,0466	Mutagen	Positive
3	Methyl 3,5-ditert-butyl-4-hydroxybenzoate	95,00 1042	22,8946	100,0000 00	3,1932	Non-mutagen	Negative
4	Phytol	100,0 0000 0	37,6292	100,0000 00	19,0797	Non-mutagen	Negative
5	Longifolene	100	23,4939	92,35275 7	11,1806	Mutagen	Positive
6	Limonene	100	23,6317	100	8,27823	Mutagen	Positive
7	Methyl hexadecanoate	100	45,8362	100	13,9493	Non-mutagen	Positive
8	Curcumin	94,40 3394	20,0731	88,03037 8	0,09135 45	Non-mutagen	Positive
9	10-octadecenoic acid	98,29 7110	22,7718	100,0000 00	5,96318	Mutagen	Positive
10	Linalool anthranilate	100,0 0000 0	29,355	100,0000 00	6,12506	Mutagen	Negative
11	Taxifolin	60,16 3717	3,42307	95,16446 9	0,16696 4	Mutagen	Positive
12	Eriodictyol	77,43 0116	4,5336	100,0000 00	0,38027 1	Mutagen	Positive
13	Luteolin	79,42 7233	4,53973	99,71723 3	0,36758 2	Mutagen	Positive
14	(+)-catechin	66,70 7957	0,656962	100,0000 00	0,39491 3	Mutagen	Negative
15	(-)-epicatechin	66,70 7957	0,656962	100,0000 00	0,39491 3	Mutagen	Negative
16	Asam tolfenamat	95,52 6033	22,4094	92,54135 7	1,21139	Mutagen	Negative



Gambar 1. Interaksi Senyawa Asam Tolfenamat dengan Reseptor COX-2

Hasil simulasi docking senyawa dengan reseptor dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan hasil visualisasi, diketahui bahwa asam tolfenamat memiliki 8 asam amino penting yaitu TYR A:385, SER A:530 yang berperan dalam ikatan hidrogen, ALA A:527 yang berperan dalam ikatan pi-sigma dan LEU A:352, LEU A:531, VAL A:523, VAL A:349, VAL A:116 yang berperan dalam ikatan pi-alkyl seperti yang terlihat dalam Gambar 1.

Lalu, pada hasil visualisasi senyawa uji dengan reseptor, diketahui bahwa hanya senyawa luteolin yang memiliki 2 interaksi asam amino yang sama seperti interaksi asam tolfenamat sebagai ligan standar dengan reseptor COX-2 yaitu TYR AG:385 dan SER A:530. Interaksi luteolin dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 2.

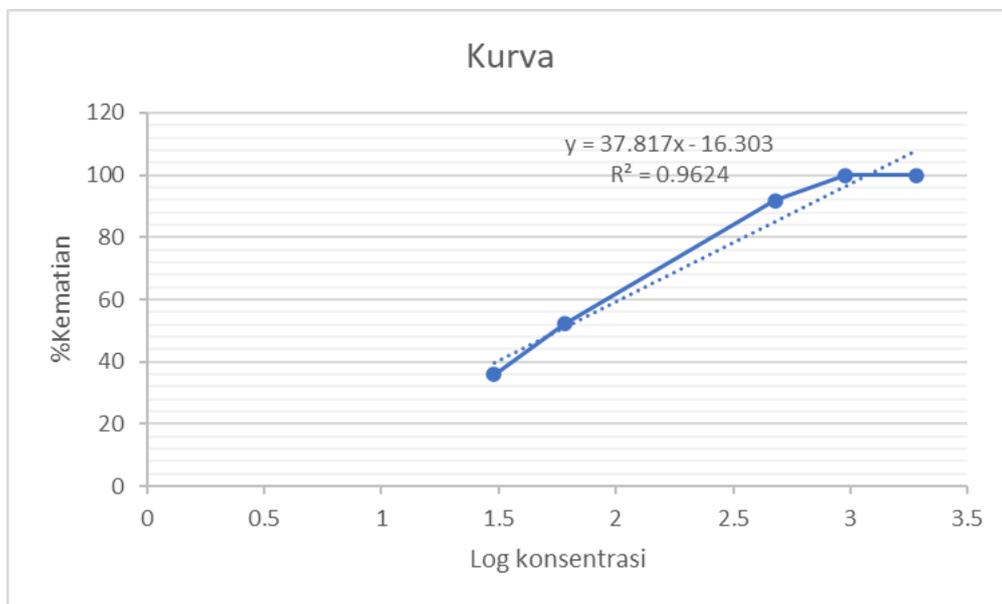


Gambar 2. Interaksi Senyawa Luteolin dengan Reseptor COX-2

Tabel 4. Hasil Uji Toksisitas Buah Asam Jawa

Konsentrasi Larutan (ppm)	Jumlah Larva Uji	Jumlah Larva Hidup	Jumlah Larva Mati	%Kematian
30	13	2	11	84,615
	13	8	5	38,46
	12	8	4	33,33
60	12	6	6	50
	8	5	3	37,5

	3	1	2	66,67
120	10	7	3	30
	13	4	9	69,23
	12	9	3	25
240	11	0	11	100
	12	0	12	100
	15	4	11	73,33
480	13	1	12	92,3
	12	0	12	100
	12	2	10	83,33
960	15	0	15	100
	11	0	11	100
	14	0	14	100
1920	11	0	11	100
	10	0	10	100
	14	0	14	100



Gambar 3. Kurva Hasil Uji Toksisitas Buah Asam Jawa

Hasil dari uji toksisitas dengan Metode BSLT ini dapat dilihat pada Tabel 4. Kurva dibuat dengan menghubungkan antara log konsentrasi sebagai sumbu x dengan % kematian sebagai sumbu y (Gambar 3).

Pada pembuatan kurva, telah dilakukan penghilangan 2 titik yaitu pada konsentrasi 120 dan 240 ppm (Tabel 5) karena nilai regresi yang didapatkan sebelumnya masih kurang baik

dimana nilai regresi yang baik adalah mendekati 1. Pada pengujian kali ini, didapatkan konsentrasi LC50 sebesar 56,234 ppm sehingga tingkat toksisitasnya tergolong toksik.

Tabel 5. Data Log Konsentrasi dan Rata-rata %Kematian

Konsentrasi Larutan Uji	Log Konsentrasi Larutan Uji	Rata-rata % Kematian
30	1,48	35,895
60	1,78	52,085
480	2,68	91,887
960	2,98	100
1920	3,28	100

PEMBAHASAN

Pengujian *in silico* dilakukan sebagai upaya dalam penemuan obat baru dengan bantuan komputer. Uji dengan metode komputasi ini merupakan suatu eksperimen yang menggambarkan interaksi antara suatu senyawa atau ligan dengan molekul targetnya. Pada pengujian ini, dilakukan pengujian *Lipinski Rule of Five* (RO5) terhadap lima belas senyawa target pada tanaman asam jawa dan juga terhadap senyawa obat sebagai pembanding. Kelima belas senyawa target itu, antara lain Diphenyl-ether, Caryophyllene, Methyl 3,5- ditert- butyl-4 -hydroxybenzoate, Phytol, Longifolene, Limonene, Methyl hexadecanoate, Curcumin, 10-octadecenoic acid, Linalool anthranilate, Taxifolin, Eriodictyol, Luteolin, (+)-catechin, dan (-)-epicatechin. Senyawa obat yang digunakan sebagai pembanding pada pengujian ini adalah senyawa asam tolfenamat.

Senyawa uji dikatakan memenuhi persyaratan untuk dibentuk sediaan oral apabila tidak lebih dari satu pelanggaran terhadap aturan Lipinski. Apabila senyawa uji memiliki berat molekul lebih dari 500 Dalton, maka akan sulit menembus membran sel. Nilai logP lebih dari 5 menandakan bahwa senyawa tersebut bersifat makin lipofilik atau terikat sangat kuat dengan membran sehingga sangat sulit untuk mengenali enzim target dan bersifat toksik. Namun nilai logP yang terlalu kecil bahkan sampai bernilai negatif juga tidak baik karena akan sulit untuk menembus membran lipid bilayer. Donor dan akseptor ikatan hidrogen menunjukkan besaran kapasitas ikatan hidrogen. Apabila kapasitas hidrogen semakin tinggi, maka akan semakin tinggi pula energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi senyawa. Apabila kapasitas hidrogen terlalu kecil, maka akan memperburuk kelarutan senyawa di dalam tubuh.

Selanjutnya, dilakukan pengujian ADMET pada kelima belas senyawa beserta senyawa pembanding yang dapat diprediksi melalui situs <https://preadmet.bmdrc.kr/>. Parameter *Human Intestinal Absorption* (HIA) merupakan proses dimana obat yang diadministrasikan secara oral dapat diabsorpsi oleh sistem pencernaan menuju sistem peredaran darah. Nilai 0 - 20% artinya rendah, nilai 20 - 70% artinya sedang, dan nilai 70 - 100% artinya tinggi. Permeabilitas Caco-2 menunjukkan prediksi penyerapan zat aktif pada *human colorectal adenocarcinoma cells*. Nilai 0 - 4 nm/sec artinya rendah, nilai 4 - 70 nm/sec artinya sedang, serta nilai lebih dari 70 nm/sec artinya tinggi. *Blood Brain Barrier* (BBB) merupakan parameter senyawa untuk dapat melalui saluran darah otak. Senyawa yang baik adalah senyawa yang tidak bisa melalui saluran darah otak bila merupakan obat yang tidak berhubungan dengan saraf otak. Nilai kurang dari 0,1 artinya rendah, nilai 0,1 - 2 artinya sedang, dan nilai lebih dari 2 artinya tinggi. *Plasma Protein Binding* (PPB) mengacu pada sebanyak apa obat yang terikat pada protein di dalam darah. Efisiensi obat dapat dipengaruhi oleh seberapa besar ia mengikat. Semakin sedikit ikatan suatu obat dengan protein plasma, semakin efisien obat tersebut dapat melintasi membran sel.

Protein plasma umum yang mengikat obat antara lain albumin, lipoprotein, glikoprotein, α , β , dan γ globulin. Nilai lebih dari 90% artinya berikatan kuat dengan protein plasma (efisiensi obat rendah) dan nilai kurang dari 90% artinya berikatan lemah dengan protein plasma (efisiensi obat tinggi). Efek mutagenik yang dapat memicu terjadinya mutasi genetik di dalam sel serta efek karsinogenik yang dapat bersifat kanker juga menjadi parameter penting untuk memprediksi sifat senyawa uji apakah dapat dikonsumsi oleh manusia atau tidak.

Kemudian, sebelum dilakukan simulasi penambatan molekuler (*molecular docking*) pada senyawa-senyawa tersebut, dilakukan validasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa metode yang digunakan memenuhi syarat validitas dan dapat digunakan pada pengujian molekul lainnya. Validasi ini dilakukan dengan melakukan penambatan ulang (*Re-docking*) suatu reseptor dengan ligan standarnya. Reseptor yang menjadi target dalam pengujian ini adalah reseptor COX-2 dengan kode 5IKT sedangkan ligan standar yang digunakan yaitu asam tolfenamat. Hasil validasi metode pada pengujian ini dikatakan baik karena memiliki nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) $\leq 2,0 \text{ \AA}$ sehingga simulasi penambatan molekuler dapat dilakukan. Tujuan dilakukan simulasi ini adalah untuk melihat apakah terjadi interaksi antara senyawa-senyawa uji dengan reseptor target. Pada tahap ini, dihasilkan nilai *binding energy* dan K_i , dimana semakin kecil nilai dari parameter *binding energy* tersebut maka semakin kecil energi yang dibutuhkan untuk berikatan dengan reseptor target dan semakin efektif pula senyawa dalam kinerja farmakologinya. Semakin kecil nilai K_i menunjukkan kompleks yang terbentuk antara ligan dan reseptor sangat kuat. Apabila dikaitkan dengan afinitas, konstanta inhibisi yang semakin kecil akan membuat pengikatan semakin baik, maka kompleks ligan dan reseptor akan semakin stabil. Dari tabel 3, dapat dilihat bahwa senyawa curcumin memiliki nilai *binding energy* dan K_i terendah yaitu -8,49 kkal/mol dan 0,596 μM . Selain itu, dilakukan juga visualisasi dari setiap hasil docking yang didapat. Visualisasi ini bertujuan untuk mengetahui asam amino apa saja yang berperan dalam interaksi kedua senyawa yang diujikan. Berdasarkan hasil visualisasi, diketahui bahwa asam tolfenamat memiliki 8 asam amino penting yaitu TYR A:385, SER A:530 yang berperan dalam ikatan hidrogen, ALA A:527 yang berperan dalam ikatan pi-sigma dan LEU A:352, LEU A:531, VAL A:523, VAL A:349, VAL A:116 yang berperan dalam ikatan pi-alkyl seperti yang terlihat dalam Gambar 1. Lalu, pada hasil visualisasi senyawa uji dengan reseptor, diketahui bahwa hanya senyawa luteolin yang memiliki 2 interaksi asam amino yang sama seperti interaksi asam tolfenamat sebagai ligan standar dengan reseptor COX-2 yaitu TYR A:385 dan SER A:530. Interaksi luteolin dengan reseptor COX-2 dapat dilihat pada Gambar 2.

Lalu, dilakukan juga uji toksisitas pada Buah Asam Jawa dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Kelebihan dari metode BSLT ini adalah biayanya yang relatif murah dan mudah dilakukan. Uji ini dilakukan untuk menentukan potensial suatu senyawa sebagai racun dengan mengetahui tingkat toksisitas dari suatu ekstrak. Berdasarkan studi literatur, daging buah asam jawa memiliki efek toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 237,147 ppm.^[6] LC_{50} merupakan konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi yang terpapar.^[7] Pada pengujian kali ini, variasi konsentrasi yang perlu dibuat adalah 30, 60, 120, 240, 480, 960, dan 1920 ppm. Masing-masing konsentrasi tersebut diujikan pada 10-20 larva udang secara triplo atau tiga kali replikasi. Larva udang dipilih karena memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap senyawa yang bervariasi. Selain itu, larva udang dapat menetas dalam waktu singkat sehingga hasil pengujian dapat diperoleh dengan cepat. Kemudian, kurva dibuat dengan menghubungkan antara log konsentrasi sebagai sumbu x dengan %kematian sebagai sumbu y (Gambar 3). Pada pembuatan kurva, telah dilakukan penghilangan 2 titik yaitu pada konsentrasi 120 dan 240 ppm (Tabel 5) karena nilai regresi yang didapatkan sebelumnya masih kurang baik dimana nilai regresi yang baik adalah mendekati 1. Dengan adanya penghilangan titik tersebut, nilai regresi yang didapat semakin baik yaitu 0,9624 dengan persamaan $y = 37,817x - 16,303$. Lalu, konsentrasi LC_{50} didapatkan dengan mensubstitusi 50% ke dalam persamaan

tersebut. Menurut Meyer (1982), terdapat 3 tingkat toksisitas suatu ekstrak yaitu sangat toksik ($LC_{50} < 30$ ppm), toksik ($LC_{50} 31-1000$ ppm), dan tidak toksik ($LC_{50} > 1000$ ppm).^[8] Pada pengujian kali ini, didapatkan konsentrasi LC_{50} sebesar 56,234 ppm sehingga tingkat toksisitasnya tergolong toksik.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap 15 senyawa uji, terdapat 1 senyawa yang memenuhi kriteria berdasarkan parameter prediksi ADME dan toksisitas, parameter penambatan molekuler, serta parameter *Lipinski's Rule of Five*. Dari 15 senyawa tersebut, didapatkan senyawa luteolin dengan interaksi yang sama atau paling mendekati dengan interaksi asam amino pada asam tolfenamat sebagai obat pembandingnya. Pada penelitian ini juga dilakukan uji toksisitas terhadap buah asam jawa menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan didapatkan hasil bahwa ekstrak dari buah asam jawa tergolong toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 56,234 ppm.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih atas dukungan, inspirasi dan bantuan kepada semua pihak dalam membantu peneliti menyelesaikan penelitian ini, termasuk pada peserta yang telah bersedia berpartisipasi dalam penelitian hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Gad SC. Encyclopedia of Toxicology 3rd Edition. US: Academic Press; 2014
- Suherman M, Prasetiawati R, Ramdani D. Skrining virtual senyawa aktif asam jawa (*Tamarindus indica* L.) terhadap selektif inhibitor siklooksigenase-2. Jurnal Ilmiah Farmako Bahari. 2020;11(2):125-136.
- Harirforoosh S, Asghar A, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal anti inflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular, and renal complications. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. 2013;16(5):821-847.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews. 2012;64:4-17.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam LB, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica. 1982;45:31-34.
- Prasetyo NF, Kepel BJ, Bodhi W, Fatimawati, Manampiring A, Budiarto F. Molecular docking terhadap senyawa isoeleutherin dan isoeleutherol sebagai penghambat pertumbuhan SARS-CoV-2. eBiomedik. 2021;9(1):101-106.
- Puspitasari E, Rozirwan, Hendri M. Uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada ekstrak mangrove (*Avicennia Marina*, *Rhizophora Mucronata*, *Sonneratia Alba* dan *Xylocarpus Granatum*) yang berasal dari Banyuasin, Sumatera Selatan. Jurnal Biologi Tropis. 2018;18(1):91-103.
- Rachmawati R. Toksisitas ekstrak etanol 80% daging buah asam jawa (*Tamarindus indica* Linn.) dengan metode brine shrimp lethality test (skripsi). Surabaya: Universitas Surabaya; 2011.