

**AKTIVITAS ANTI-RHEUMATOID ARTHRITIS DARI BRAZILIN DAN BRAZILEIN
SECARA *IN SILICO***

G. A. K. Amarawati*, N. M. P. Susanti dan N. P. L. Laksmiani

*Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia***e-mail: ayukristi80@gmail.com***ABSTRAK**

Rheumatoid arthritis merupakan penyakit autoimun kronis dengan gejala berupa rasa nyeri dan inflamasi yang terjadi pada sendi tubuh dan dapat menetap sebagai gejala permanen. Proses inflamasi yang terjadi dapat mengakibatkan destruksi sendi secara menyeluruh. Produksi sitokin pro-inflamasi seperti *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dapat menyebabkan autoimunitas. TNF- α aktif berperan dalam terjadinya inflamasi kronis, yang mana pembentukan TNF- α aktif diregulasi oleh TNF- α *Converting Enzyme* (TACE). Brazilin dan brazilein diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi dan immunomodulator dapat berpotensi sebagai anti-*rheumatoid arthritis*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui afinitas dan mekanisme senyawa brazilin dan brazilein terhadap protein target TACE sebagai anti-*rheumatoid arthritis* secara *in silico* dengan menggunakan metode *molecular docking*. Penelitian dilakukan secara eksploratif dengan tahapan penyiapan database struktur 3D brazilin, brazilein, serta protein TACE, optimasi struktur 3D brazilin dan brazilein, preparasi protein, validasi metode *molecular docking*, serta *docking* brazilin dan brazilein pada protein-protein tersebut. Hasil *docking* dinilai dari energi ikatan dan ikatan hidrogen yang terbentuk antara brazilin dan brazilein pada protein. Semakin kecil nilai energi ikatan maka ikatan antara brazilin dan brazilein dengan protein semakin kuat dan stabil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa brazilin dan brazilein memiliki aktivitas sebagai anti-*rheumatoid arthritis* karena mampu menghambat protein TACE dengan nilai energi ikatan masing-masing -7,24 untuk brazilin dan -7,59 untuk brazilein. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa brazilin dan brazilein berpotensi menghambat proses inflamasi dan mencegah destruksi sendi pada *rheumatoid arthritis*.

Kata kunci: brazilein, brazilin, *in silico*, *rheumatoid arthritis***ABSTRACT**

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that occur by inflammation chronic which persist as a permanent symptom. That inflammatory process caused joint destruction. Production of pro-inflammatory sytokin such as Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) stimulate an autoimmunity. Active TNF- α plays a role in the occurrence of chronic inflammation, in which the formation of active TNF- α is regulated by TNF- α *Converting Enzyme* (TACE). Brazilin and brazilein are known to have anti-inflammatory activity and immunomodulator potentially as anti-rheumatoid arthritis. The purpose of this study were to determine the affinity and mechanisms of brazilin and brazilein against TACE proteins as anti-rheumatoid arthritis performed using molecular docking method. The study was conducted exploratively with several steps such as databases preparation of 3D structures brazilin, brazilein, TACE protein, optimization of brazilin and brazilein 3D structures, protein preparation, molecular docking method validation, and docking brazilin and brazilein in these proteins. The docking results are assessed from the binding energy and hydrogen bonds formed between brazilin and brazilein in proteins. The smaller value to the binding energy, will made the bond between brazilin and brazilein with proteins will be stronger and more stable. The results showed that brazilin and brazilein have activities as anti-rheumatoid arthritis because they are able to inhibit TACE proteins with respective bond energy values -7,24 for brazilin and - 7,59 kcal/mol for brazilein. These results show that brazilin and brazilein have the potential to inhibit inflammatory process and joint destruction in rheumatoid arthritis.

Keywords : brazilin, brazilein, *in silico*, rheumatoid arthritis**PENDAHULUAN**

Rheumatoid arthritis merupakan penyakit autoimun kronis dengan jumlah penderita di Indonesia tercatat sejak tahun

2009 sebesar 23,6 % sampai 31,3 %. Gejala penyakit ini berupa rasa nyeri dan inflamasi yang terjadi pada sendi tubuh dan dapat menetap sebagai gejala permanen. Patologi dari *rheumatoid arthritis* paling banyak

dipengaruhi oleh beberapa sitokin yang disintesis melalui proses induksi sistem imun. Produksi sitokin *pro-inflammatory* seperti *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1), dan *interleukin-6* (IL-6) dapat menyebabkan autoimunitas (Awaludin, dkk., 2017).

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama yang memegang peran penting dalam munculnya *rheumatoid arthritis*, hal ini dikarenakan TNF- α tidak hanya diproduksi oleh makrofag teraktivasi, tetapi juga di monosit, fibroblast, *mast cell* dan *NK cell*, yang mana bertanggung jawab dalam menginduksi sinyal dalam jalur pembentukan imun berkaitan dengan terbentuknya faktor inflamasi. Penghambatan TNF- α dapat menekan fungsi makrofag dan sel T sehingga mengurangi intensitas perkembangan inflamasi. TNF- α dapat berikatan dengan reseptor TNFR jika berada dalam bentuk aktifnya, yang mana perubahan pro TNF- α menjadi TNF- α aktif diregulasi oleh TNF- α *Converting Enzyme* (TACE). Sehingga, penghambatan fungsi TACE dapat menekan produksi TNF- α aktif.

Tiga kelas obat umum telah direkomendasikan untuk terapi *rheumatoid arthritis* diantaranya agen *non steroidal anti-inflammatory drug* (NSAID), kortikosteroid dan *disease modifying antirheumatic drugs* (DMARD). Ketiga kelas obat ini mampu mengurangi peradangan akut dan nyeri pada pasien *reumathoid arthritis*, akan tetapi tidak mampu menghentikan jalannya penyakit atau mencegah kerusakan sendi. *Methotrexate* sebagai terapi lini pertama pada pengobatan *rheumatoid arthritis* memiliki efek samping yang perlu diperhatikan diantaranya kelainan fungsi hati, gangguan paru-paru, stomatitis, ruam kulit, penyakit hematologi, dan pansitopenia. Maka dari itu, pemberian *methotrexate* harus dilakukan hati-hati untuk mengimbangi efek samping yang ditimbulkan (Jung, et.al., 2015).

Diperlukan suatu pengembangan terapi terhadap *rheumatoid arthritis*, salah satunya dengan eksplorasi potensi bahan alam berkhasiat. Kandungan berkhasiat dalam kayu secang diantaranya senyawa brazilin dan brazilein diketahui memiliki aktivitas farmakologi seperti antihiperqlikemia, anti-inflamasi, imunomodulator dan antikanker. Kombinasi brazilein dengan doxorubicin mampu meningkatkan apoptosis pada kanker

payudara (Laksmiani, et al., 2015). Efek farmakologis sebagai imunomodulator, anti-inflamasi, dan antioksidan dari ekstrak *Caesalpinia sappan* menunjukkan peran penting adanya potensi sebagai antiarthritis, yang mana gejala dari *rheumatoid arthritis* diantaranya adanya inflamasi pada persendian yang disebabkan karena ekspresi berlebih sistem imun serta destruksi jaringan tulang akibat peradangan (Suarjana, 2009). Menurut Jung (2015), brazilin yang diperoleh dari ekstrak etil asetat *Caesalpinia sappan* secara efektif mampu mengurangi kadar serum TNF- α , IL-1 β dan IL-6, mempertahankan permukaan tulang serta mengurangi pembengkakan pada tikus model CIA (*Cell Induced Arthritis*) yakni tikus yang telah diinduksi dengan faktor arthritis. Data tersebut menunjukkan adanya potensi brazilin sebagai senyawa aktif yang dapat digunakan untuk terapi *rheumatoid arthritis*.

Pengujian terhadap potensi brazilin dan brazilein sebagai agen anti-*rheumatoid arthritis* dapat dilakukan dengan mengetahui afinitas dan mekanisme molekuler kedua senyawa tersebut terhadap protei target yakni enzim TACE menggunakan metode molecular docking. Teknik kimia komputasi ini dapat digunakan untuk mempercepat pemilihan senyawa yang akan diisolasi atau disintesis melalui identifikasi dan optimasi senyawa-senyawa penuntun di dalam proses penemuan obat dengan menggunakan pemodelan komputer (*in silico*). Maka dari itu, potensi brazilin dan brazilein dalam menghambat fungsi enzim TACE secara molekuler dapat diketahui. Penggunaan metode molecular docking dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi penelitian dalam pengembangan agen anti-*rheumatoid arthritis* (Doyle dan Griffiths, 2000).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Struktur 3 dimensi dari senyawa brazilin dan brazilein yang diunduh pada *website* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, dipreparasi pada program Hyperchem 8. Struktur protein target yakni enzim TACE (*TNF-alfa Converting Enzyme*) (pdb id : 3 KME) yang diunduh dari *website protein data bank* <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

Alat

Seperangkat komputer dengan spesifikasi *Windows 8 64 bit* dilengkapi program *Hyperchem 8*, *Chimera 1.10.1*, dan *AutoDock Tools*.

Metode Penelitian

Optimasi Struktur 3D Senyawa Brazilin dan Brazilein

Struktur 3D senyawa brazilin dan brazilein yang telah diunduh kemudian dioptimasi dengan menggunakan program *HyperChem 8*. Metode komputasi yang digunakan adalah metode komputasi semi-empiris AM1, dan dilakukan kalkulasi *single point* serta optimasi geometri.

Preparasi Struktur 3D Protein

Proses preparasi protein dilakukan dengan memisahkan struktur 3D protein TACE dengan *native ligand*-nya menggunakan aplikasi *Chimera 1.10.1*

Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode *docking molecular* dilakukan dengan *redocking Native ligand* pada protein TACE yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program *Autodock 4.2* dengan parameter RMSD. Batas nilai *Root mean square distances* (RMSD) yang dapat diterima adalah $\leq 3 \text{ \AA}$ (Laksmiani, *et al.*, 2018).

Docking Brazilin dan Brazilein Pada Protein TACE

Senyawa brazilin dan brazilein yang teroptimasi selanjutnya di-docking-kan pada protein TACE yang telah dipisahkan dari *native ligand*-nya menggunakan program *Autodock 4.2* dengan sistem protokol yang sama seperti pada validasi metode. Hasil analisis akan menunjukkan konformasi ikatan senyawa uji pada protein dengan data nilai energi ikatan dan ikatan hidrogen yang terbentuk.

Analisis Data

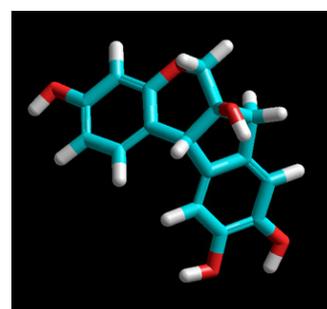
Hasil dari *molecular docking* adalah energi ikatan. Nilai energi ikatan menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dan reseptor.

Semakin rendah harga energi ikatan, maka ikatannya semakin kuat dan stabil.

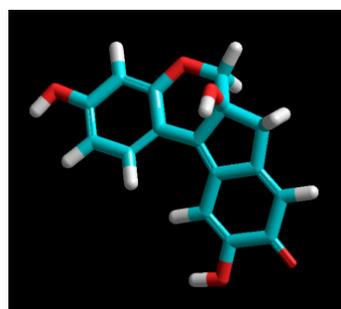
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Struktur 3D Senyawa Brazilin dan Brazilein

Optimasi struktur brazilin dan brazilein yang telah diunduh dilakukan pada program *Hyperchem 8* dengan metode kalkulasi AM1 (*Austin model 1*), yang mana pada proses ini dilakukan kalkulasi *single point* dan *geometry optimization* untuk mendapatkan struktur senyawa brazilin dan brazilein yang paling stabil dengan energi total terendah. Hasil dari optimasi struktur brazilin dan brazilein ditunjukkan pada Gambar 1.



(a)



(b)

Gambar 1. Hasil Optimasi Struktur tiga Dimensi Senyawa Brazilin (a) dan Brazilein (b)

Besar energi total hasil kalkulasi *single point* yang diperoleh untuk brazilin dan brazilein berturut-turut adalah $-3922,630823$ kkal/mol dan $3719,872723$ kkal/mol. Proses selanjutnya dilanjutkan dengan optimasi geometri. Besar energi hasil optimasi geometri yang diperoleh untuk brazilin dan brazilein berturut-turut adalah $-3924,4933$ kkal/mol dan $-3776,9078$ kkal/mol. Pada proses optimasi

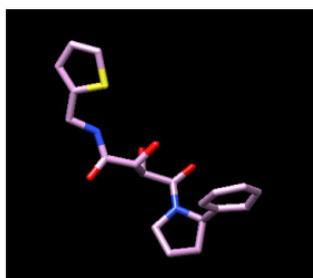
geometri, energi total molekul diminimalisasi sehingga senyawa uji menjadi lebih stabil (Fitriasari dkk., 2008).

Preparasi Struktur 3D Protein TACE

Protein TACE dipreparasi dengan memisahkan *native ligand* dari struktur protein menggunakan program *Chimera 1.10.1* sehingga dihasilkan struktur protein TACE tanpa *native ligand*-nya dan struktur *native ligand* yang terpisah seperti pada gambar 2. Pemisahan *native ligand* dari struktur protein bertujuan untuk menyediakan *pocket* yang nanti digunakan sebagai ruang tempat berikatan senyawa uji (brazilin dan brazilein) pada protein target TACE. Rantai protein yang dipilih dalam pengujian ini adalah rantai B yang berikatan dengan ligan (2*R*, 3*R*)-2,3-dihydroxy-1-oxo-[9*2R*0-2-phenylpyrrolidin-1-yl]-*N*-(thiophen-2-ylmethyl) butanamide dengan ID Z59 yang mana ligan tersebut berfungsi sebagai inhibitor enzim TACE (Rosner *et al.*, 2010).



(a)



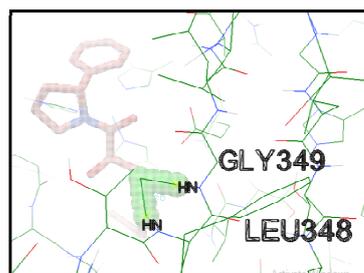
(b)

Gambar 2. Struktur 3 Dimensi Protein TACE tanpa ligan (a) dan *native ligand* protein TACE (b)

Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan penambatan ulang (*redocking*) *native ligand* pada protein TACE

yang telah dihilangkan *native ligand*-nya dan telah dipreparasi menggunakan program Autodock 4.2. Parameter yang dinilai dalam validasi metode ini adalah RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD adalah ukuran yang menyatakan penyimpangan posisi ikatan *native ligand* yang diperoleh secara eksperimental dibandingkan dengan yang sebenarnya. Semakin besar nilai RMSD, maka penyimpangan posisi ikatan juga semakin besar sehingga kemungkinan kesalahan prediksi ikatan saat dilakukan *docking* senyawa uji juga semakin besar. Batas nilai RMSD yang dapat diterima adalah $\leq 3 \text{ \AA}$ (Jain dan Nicholls, 2008). Nilai RMSD yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar 1,97 Å. Berdasarkan hasil tersebut, metode yang digunakan dapat dikatakan valid. Visualisasi interaksi validasi metode *molecular docking* dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi Interaksi Antara *Native ligand* dengan Protein TACE.

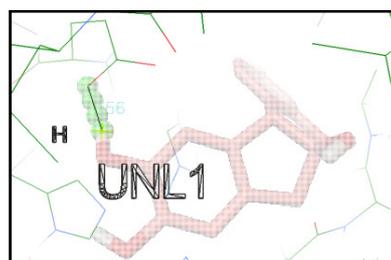
Docking Brazilin dan Brazilein Pada Protein TACE

Penambatan molekul brazilin dan brazilein pada protein TACE dilakukan pada program Autodock 4.2 dengan koordinat yang sama seperti pada validasi metode yang telah dinyatakan valid. Berdasarkan hasil *docking*, diperoleh 10 konformasi ikatan antara brazilin dan brazilein pada protein TACE, yang mana dari 10 konformasi tersebut dipilih satu konformasi dengan energi ikatan terendah. energi ikatan yang paling rendah menunjukkan konformasi dengan ikatan yang paling stabil. Hasil dan visualisasi *docking* yang terjadi antara brazilin dan brazilein dengan protein TACE dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 4. Berdasarkan hasil *docking*, energi ikatan antara brazilin dan brazilein dengan protein TACE bernilai negatif, yakni sebesar -7,24 kkal/mol untuk brazilin dan -7,59 kkal/mol

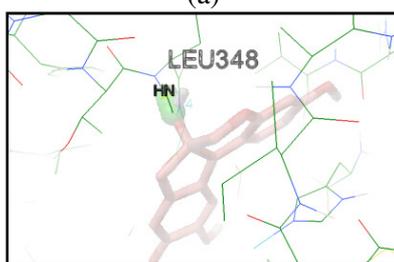
untuk brazilein. Hal tersebut berarti senyawa uji brazilin dan brazilein mampu berinteraksi dengan protein TACE dan membentuk ikatan pada protein target. Brazilin dapat berinteraksi dengan protein TACE yakni dengan membentuk ikatan hidrogen pada asam amino GLU406, sedangkan brazilein berinteraksi dengan membentuk ikatan hidrogen pada asam amino LEU438. Maka dari itu, berdasarkan hasil yang diperoleh diprediksi brazilin dan brazilein mampu menghambat kerja TACE sehingga dapat mencegah pembentukan berlebih sitokin pro-inflamasi *TNF-alfa* pada penderita *rheumatoid arthritis* melalui pembentukan ikatan hidrogen pada protein-protein tersebut dengan afinitas yang ditunjukkan oleh energi ikatan keduanya yang bernilai negatif.

Tabel 1. Hasil *Docking* Brazilin dan Brazilein Pada ProteinTACE

Ligan	Energi Ikatan (Kkal/mol)	Ikatan Hidrogen
Brazilin	-7,24	GLU406
Brazilein	-7,59	LEU438



(a)



(b)

Gambar 4. Visualisasi Interaksi Hasil *Docking* Brazilin (a) dan Brazilein (b) Pada Protein TACE.

KESIMPULAN

Brazilin dan Brazilein memiliki afinitas terhadap protein TACE yang ditunjukkan dengan energi ikatan untuk brazilin dan brazilein masing-masing -7,24 dan -7,59 kkal/mol, sehingga berpotensi menghambat

pembentukan berlebih sitokin pro-inflamasi pada *rheumatoid arthritis* dengan penghambatan enzim TACE melalui pembentukan ikatan hidrogen pada protein tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen-dosen pembimbing, keluarga penulis, teman-teman dan semua pihak yang telah sangat membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Awaluddin, R., Muhtadi, W. K., Chabib, L., Ikawati, Z., Martien, R., Ismail, H. 2017. Molecular Docking and ADME-Toxicity Studies Of Potential Compounds Of Medicinal Plants Grown In Indonesia as An Anti-rheumatoid Arthritis. *International Conference Chemistry*.
- Doyle, A. and Griffiths, J. B. 2000. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, Chichester: Wiley.
- Fitriasari, A., Wijayanti, N. K., Ismiyati, N., Dewi, D., Kundarto, W., Sudarmanto, B. S. A., Meiyanto, E. 2008. Studi Potensi Kurkumin dan Analognya sebagai Selective Estrogen Receptor Modulator (SERMs): Docking pada Reseptor Estrogen β . *Pharmacol.* 9(1): 27-32.
- Jain, A. J., dan Nicholls, A. 2008. Recommendations for evaluational methods. *J. Comput. Aided Mol.* 22: 133-139.
- Jung, E. G., Han, K. I., Hwang, S. G., Kwon, H. J., Patnaik, B. B., Kim, Y. H., Han, M. D. 2015. Brazilin Isolated from *Caesalpinia sappan* L. Inhibit Rheumatoid arthritis Activity in A Type-II Collagen Induced Arthritis Mouse Model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. (15).
- Laksmiani, L., Susidarti, R. A., Meiyanto, E. D. Y. 2015. Brazilein Increases The Sensitivity Of Doxorubicin On MCF-7 Resistant Doxorubicin (MCF-7/DOX) Cells Through Inhibition Of HER-2 Activation, *International Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7(2): 525-528.

- Laksmiani, L., Astuti, N. M. W., Arisanti, C. I. S., Paramita, N. L. P. V. 2018. Ethyl Acetate Fraction Of Secang As Anti Cervical Cancer By Inducing p53 and Caspase 9, *IOP Conf. Series: Earth and Enviromental Science* (2018) 012065.
- Rosner, K. E., Guo, Z., Orth, P., Shipps Jr., G. W., Belanger, D. B., Chan, T. Y., Curran, P. J., Dai, C., Deng, Y., Girjavallabhan, V. M., Hong, L., Lavey, B. J., Lee, J. F., Li, D., Liu, Z., Muller, J. P., Ting, P. C., Vaccaro, H., Wang, L., Wang, T., Yu, W., Zou, G., Niu, X., Sun, J., Kozlowski, J. A., Lundell, D. J., Madison, V., McKittrick, B., Piwinski, J. J., Shih, N. Y., Siddiqui M. A., and Strickland. C. O. 2010. The Discovery of Novel Tartrate-Based TNF- α Converting Enzyme (TACE) Inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 20: 1189-1193.
- Suarjana, I. N. 2009. *Arthritis Rheumatoid dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit*, Edisi V. Soyo A. W., Setiyohadi, B., Alwi, Idrus, *et al.* Jakarta: Interna Publishing.