

**Anti Aterosklerosis Andrografolid dari Sambiloto melalui Mekanisme
Antiinflamasi secara *In Silico***

Susanti, N. M. P.¹, Laksmiani, N. P. L.¹, Warditiani, N. K.¹, Sunariyani, P. E. A.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: Putu Eka Ayu Sunariyani

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Jalam Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 703837

Email: eka.sunariyani37@gmail.com

ABSTRAK

Andrografolid merupakan senyawa yang banyak terkandung dalam sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f Ness) yang memiliki aktivitas antiinflamasi. Adanya respon inflamasi kronis pada sel endotel yang mampu menimbulkan pembentukan dan penebalan plak di dinding pembuluh darah disebut aterosklerosis, yang merupakan penyebab penyakit kardiovaskuler. Salah satu mekanisme menghambat aktivitas inflamasi pada aterosklerosis dapat dilakukan terhadap protein *nuclear factor-kappa Beta* (NF- κ B).

Docking molecular dilakukan dengan menggunakan program Autodock 4.2 yang meliputi penyiapan database protein dan struktur 3D andrografolid, preparasi protein, validasi metode *docking molecular*, optimasi struktur 3D andrografolid, *docking molecular* andrografolid terhadap protein NF- κ B dengan parameter energi ikatan. Semakin rendah energi ikatan, maka ikatan antara andrografolid dengan protein semakin kuat dan stabil.

Hasil yang diperoleh andrografolid memiliki aktivitas antiinflamasi karena mampu menghambat protein NF- κ B dengan energi ikatan -6,49 kkal/mol yang membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Arg416, Cys533. Energi ikatan andrografolid yang mendekati dengan energi ikatan native ligand BLZ sebesar -8,58 kkal/mol pada protein NF- κ B menunjukkan andrografolid mampu berikatan dengan protein NF- κ B, sehingga andrografolid dapat mencegah pembentukan plak di pembuluh darah pada aterosklerosis.

Kata kunci : andrografolid, anti aterosklerosis, mekanisme, antiinflamasi, NF- κ B

1. PENDAHULUAN

Aterosklerosis atau pembentukan plak di dinding pembuluh darah, merupakan faktor resiko terjadinya PJK (Penyakit Jantung Koroner). Aterosklerosis diawali dengan masuknya *low density lipoprotein* (LDL) ke dalam lapisan pembuluh darah (lapisan intima). Adanya LDL pada bagian intima akan menyebabkan sel endotel mengalami inflamasi kronis sehingga homeostatis sel endotel akan hilang, sehingga endotel akan teraktivasi menghasilkan proinflamasi sitokin^[3]. Proinflamasi sitokin meliputi monosit, makrofag, interferon- γ , interleukin-1, interleukin-6, nitrat oksida dan tumor necrosis factor-a (TNF-a) yang mampu mengaktifkan jalur protein NF- κ B (Francis and Pierce, 2011; Tedgui and Mallat, 2006)

Teraktivasi jalur NF- κ B akan meningkatkan ekspresi gen proinflamasi seperti VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) dan E-

selektin (Endotelial Selektin) yang akan menimbulkan inflamasi (Warboys, 2011). Dengan adanya respon inflamasi akan memicu leukosit untuk menempel pada sel endotel sehingga permeabilitas sel endotel akan meningkat. Meningkatnya permeabilitas sel endotel menyebabkan monosit akan bermigrasi ke daerah intima dan berdiferensiasi menjadi makrofag untuk menfagositosis LDL yang ada pada sel endotel, kemudian membentuk sel busa. Terbentuknya sel busa akan mengaktifasi sel otot polos halus bermigrasi dari bagian media ke intima dan berproliferasi menjadi jaringan fibrous, sehingga akan terbentuk plak di pembuluh darah^[5].

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) adalah tanaman banyak dimanfaatkan untuk pengobatan. Andrografolid adalah salah satu senyawa golongan diterpen laktone yang kandungannya besar pada tanaman sambiloto (Sundowo and Kardono, 2002). Beberapa penelitian telah

menunjukkan aktivitas andrografolid yakni andrografolid secara signifikan mampu menghambat agregasi platelet yang menginduksi trombin dengan menghambat protein ERK1, ERK2 (*Extracellular signal-regulated kinase1/2*) (Chao, 2010).

Docking molecular adalah suatu metode yang digunakan dalam kimia komputasi dan desain obat dengan bantuan komputer. Tujuannya untuk memprediksi orientasi ikatan ligan dan afinitas ikatan di dalam interaksi ligan-protein pada struktur 3 dimensinya (Morris, 2007). Keuntungan penelitian desain obat dengan menggunakan metode docking molecular secara *in silico* adalah bahwa proses ini secara fisik lebih dekat dengan apa yang terjadi pada kenyataan (farmakodinamik), ketika protein dan ligan mendekati satu sama lain setelah pengikatan molekul (Mukesh and Rakesh, 2011).

Berdasarkan latar belakang tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan docking molecular andrografolid dari *Andrographis paniculata* terhadap protein yang memicu pembentukan plak di pembuluh darah pada aterosklerosis untuk mengetahui mekanisme dan afinitas andrografolid dengan protein NF- κ B menggunakan program komputasi Autodock 4.2, melalui proses docking secara *in silico*.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Program yang digunakan

Cywin, Autodock 4.2, Hyperchem 8 dan chimera 1.10.1.

2.2 Preparasi Protein NF- κ B

Konformasi protein NF- κ B dicari dari protein *database*. *Native ligand* dihilangkan dengan program Chimera 1.10.1 untuk menyediakan ruang (*pocket/cavity*), sehingga diketahui bentuk *pocket*, koordinat *pocket*, *binding site center* dan *radius cavity* sebagai bahan *docking*.

2.3 Optimasi senyawa uji Sambiloto (Andrografolid)

Struktur senyawa uji dioptimasi dengan menggunakan program Hyperchem 8. Optimasi juga dilakukan pada struktur tiga dimensi senyawa lengkap dengan atom hidrogennya.

2.4 Validasi metode *docking molecular*

Validasi metode *docking molecular* dilakukan menggunakan program Autodock

4.2 dengan men-*docking*-kan kembali native ligand pada protein.

2.5 Docking Andrografolid pada NF- κ B

Senyawa uji andrografolid di-*docking*-kan pada protein menggunakan program Autodock 4.2. Hasil analisis akan menunjukkan senyawa dengan konformasi yang mana yang memiliki energi terendah untuk berikatan dengan protein target.

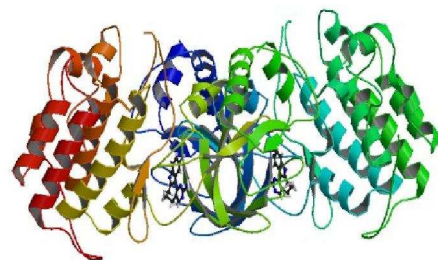
2.6 Analisis Data

Analisis dilakukan terhadap energi ikatan yang dihasilkan dari *docking molecular*. Nilai energi ikatan menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dan reseptor. Semakin rendah energi ikatan, maka ikatannya semakin kuat dan stabil. Sebaliknya, semakin tinggi energi ikatan, maka ikatannya semakin lemah dan tidak stabil. Jika energi ikatan antara andrografolid dengan NF- κ B semakin kecil, maka semakin besar interaksi yang terjadi kuat ikatan antara andrografolid dengan NF- κ B, sehingga andrografolid berpotensi sebagai penghambat aksi NF- κ B dalam proses inflamasi harapannya dapat mencegah penumpukan plak-plak lemak pada aterosklerosis

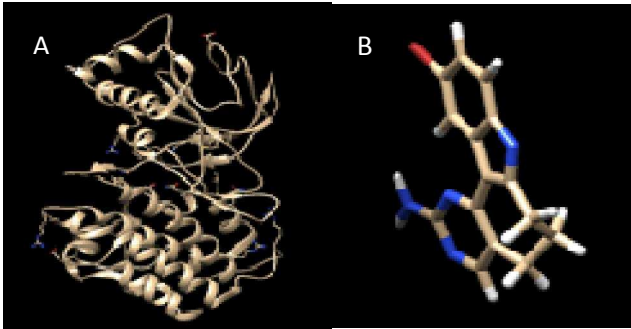
3. HASIL

3.1 Preparasi Protein NF- κ B

Protein NF- κ B diunduh dari <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> dengan ID 4IDT. Struktur 3 dimensi protein NF- κ B ID 4IDT ditampilkan pada gambar 1. Preparasi dilakukan dengan menggunakan program Chimera 1.10.1. sehingga diperoleh protein tanpa ligan dan native ligand yang ditampilkan pada gambar 2.



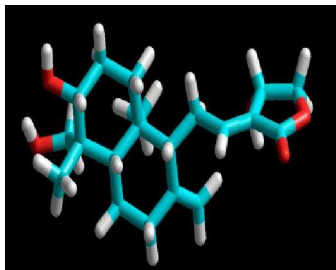
Gambar 1. Struktur 3 dimensi protein NF- κ B ID 4IDT



Gambar 2. Struktur protein tanpa ligan (A) dan *native ligand* (B)

3.2 Optimasi senyawa uji Sambiloto (Andrografolid)

Struktur 3 dimensi senyawa andrografolid diunduh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5318517>.



Gambar 3. Struktur 3 dimensi andrografolid teroptimasi

3.3 Validasi metode *docking molecular*

Validasi metode *docking molecular* dilakukan dengan me-*redocking*-kan kembali protein tanpa ligan dengan *native ligand* yang telah dipreparasi sebelumnya dengan menggunakan program Autodock 4.2. Hasil Validasi *docking molecular* NF- κ B dengan *native ligand* BLZ ditampilkan pada tabel 1. Hasil menunjukkan nilai *Root mean square distances* (RMSD) *heavy atoms native ligand* < 3 Å yang dibandingkan dengan referensi.

Tabel 1. Hasil Validasi *docking molecular* NF- κ B dengan *native ligand* BLZ

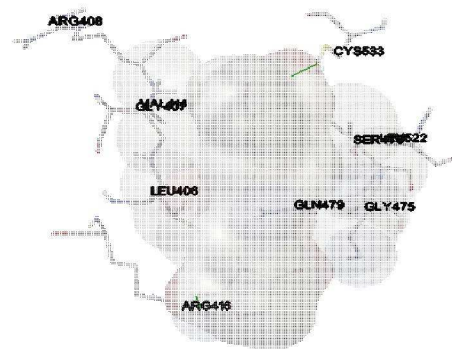
Protein	Konformasi	RMSD	Energi Ikatan(kkal/mol)	Ikatan Hidrogen
NF- κ B	1	0,40	-8,54	Glu470
	2	0,33	-8,50	Glu470
	3	0,47	-8,58	Glu470
	4	0,61	-8,47	Glu470
	5	0,57	-8,53	Glu470
	6	0,57	-8,52	Glu470
	7	0,40	-8,50	Glu470
	8	0,44	-8,57	Glu470
	9	0,33	-8,50	Glu470
	10	0,42	-8,57	Glu470

3.4 *Docking* Andrografolid pada NF- κ B

Docking andrografolid dilakukan pada protein NF- κ B dengan menggunakan program Autodock 4.2, dan pengaturan koordinat dilakukan sesuai dengan koordinat *native ligand*. Hasil *docking* andrografolid dengan protein NF- κ B ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Validasi *docking molecular* NF- κ B dengan andrografolid

Protein	Konformasi	Energi Ikatan(kkal/mol)	Ikatan Hidrogen
NF- κ B	1	-6,18	Arg416 Cys533
	2	-6,49	Arg416 Cys533
	3	-5,06	Leu406
	4	-6,15	Cys533
	5	-4,89	Leu406
	6	-5,18	Leu406
	7	-5,78	Cys533
	8	-4,73	Leu472
	9	-6,09	Arg416
	10	-4,79	Leu406



Gambar 4. Interaksi andrografolid dengan protein NF- κ B

4. PEMBAHASAN

Preparasi protein NF- κ B bertujuan untuk memisahkan protein dan *native ligand*nya agar tersedia ruang (*pocket/cavity*) saat proses *docking*. Pada preparasi protein dilakukan penghilangan terhadap molekul air (H₂O) dan *native ligand*nya bertujuan untuk menyisakan asam amino protein agar tidak menghalangi penambatan senyawa uji yang ingin di-*docking*-kan (Francis and Pierce, 2011; Mukesh and Rakesh, 2011).

Optimasi senyawa uji andrografolid dilakukan dengan menggunakan metode semiempiris AM1 pada program Hyperchem

8. Energi yang diperoleh dengan meminimalisasi geometri yakni -5509,50 kkal/mol. Energi menunjukkan kekuatan ikatan yang dibutuhkan untuk memutuskan satu mol ikatan suatu spesi dalam keadaan gas. Semakin rendah total energi molekul andrografolid, maka semakin stabil struktur 3 dimensi andrografolid tersebut, karena semakin besar energi yang dilepaskan ke lingkungan sehingga reaksi berlangsung secara eksoterm (Azam, 2012).

Validasi *docking molecular* bertujuan untuk mengetahui metode *docking* yang digunakan valid. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) adalah parameter yang menyatakan suatu metode *docking molecular* valid. RMSD merupakan suatu ukuran yang digunakan untuk memprediksi perbedaan nilai antara struktur kristalografi dengan ligan eksperimental yang di-*docking*-kan pada protein. Nilai RMSD sebesar 1-3 Å menyatakan bahwa struktur kristal eksperimental menyerupai dengan kristalografi *native ligand* pada PDB (Protein Data Bank) sehingga metode *docking molecular* sudah valid dan akurat. Untuk mendapatkan keadaan optimum dari ikatan hidrogen terhadap protein dilakukan penambahan valensi molekul dengan atom hidrogen (Fitriasari, 2009)

Suatu molekul *post-docking* dinyatakan baik bila memenuhi syarat: mempunyai energi ikatan paling rendah dan molekul berada dalam *active site* yang sama dengan *native ligand* protein (Diyah, 2013). Andrografolid memberikan nilai energi ikatan yang lebih besar dibandingkan dengan *native ligand* BLZ terhadap protein NF- κ B. *Active site* yang terbentuk antara andrografolid dengan NF- κ B dan *native ligand* dengan NF- κ B juga berbeda dengan *native ligand* yaitu pada asam amino Glu470. Namun, jika dilihat dari energi ikatan yang terbentuk antara andrografolid dengan protein NF- κ B yaitu sebesar -6,49 kkal/mol dan membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Arg416, Cys533 membuktikan bahwa andrografolid mampu menghambat protein NF- κ B. NF- κ B merupakan pemberi respon inflamasi di sel endotel, sehingga andrografolid dapat mencegah pembentukan plak di pembuluh darah pada aterosklerosis melalui mekanisme antiinflamasi.

5. KESIMPULAN

Andrografolid mampu menghambat protein NF- κ B, sehingga andrografolid dapat mencegah pembentukan plak di pembuluh darah pada aterosklerosis melalui mekanisme antiinflamasi.

6. UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DITJEN DIKTI atas bantuan biaya pada penelitian ini, juga terima kasih kepada Evi, Maitri, Indra, Redika, Andre dan tim analisis forensik Unud atas bantuan teknis dalam mempersiapkan program *docking*.

PUSTAKA

- Azam, F., A. M. Madi, H. I. Ali. 2012. Molecular Docking and Prediction of Pharmacokinetic Properties of Dual Mechanism Drugs that Block MAO-B and Adenosine A2A Receptors for the Treatment of Parkinson's Disease. *Journal of Young Pharmacists*, Volume 4, No 3.
- Chao W.W., Y.H. Kuo, B.F. Lin. 2010. Isolation and Identification of Bioactive Compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Chinese Medicine 2010*, 5:17.
- Diyah, N. W., Siswandono, S. Hardjono, B. T. Purwanto. 2013. Pemodelan Molekul dan Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Sitotoksik Turunan Benzoilurea sebagai Antitumor. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, Volume. 2 No. 2.
- Fitriasari, A., N. K. Wijayanti, N. Ismiyati, D. Dewi, W. Kundarto, B. S. A. Sudarmanto dan E. Meiyanto. 2008. Studi Potensi Kurkumin dan Analognya sebagai Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs): Docking Pada Reseptor Estrogen β . *Pharmacon*, Volume. 9, No. 1.
- Francis, A. A., and G. N. Pierce. 2011. An Integrated Approach for the Mechanisms Responsible for Atherosclerotic Plaque Regression. *Experimental & Clinical Cardiology*, volume 16 No 3.
- Morris, G.M. 2007. I get very high Reference RMSD values in my DLG; what went wrong?. *Faq Autodock*. Available at : <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/faq/i-get-very-high-rms-ref-values-what-went-wrong/?searchterm=rmsd>. Opened at : 20th April 2015.

- Mukesh, B. And K. Rakesh. 2011. Molecular Doking: A Review. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, volume 2 (6).
- Sundowo, S., Dewi, P., dan Kardono.2002. Cara Mudah Isolasi Senyawa Andrografolid dari Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*).*Prosiding Seminar Tantangan DuniaKimia*: 193-198.Serpong.
- Tedgui, A. and Z. Mallat.2006. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Review*, volume 86.
- Warboys, C.M., N. Amini, A. de Luca and Paul C. 2011. The Role of Blood Flow in Determining the Sites of Atherosclerotic Plaques. *F1000 Medicine Reports*, 3:5.