



Artikel Penelitian

Sintesis Senyawa Vanilil Metil Keton dan Uji Aktivitas Antiinflamasi terhadap Enzim COX-1 dan COX-2 melalui Analisis *In Silico*

Khoirotul Ummah^{1*}, Robby Gus Mahardika², Ana Mardiyah³¹Jurusan Pendidikan Ilmu Pengetahuan Alam, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, Indonesia, 60237²Jurusan Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Bangka Belitung, Bangka Kepulauan Bangka Belitung, Indonesia, 33126³Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Walisongo, Semarang, Indonesia, 50185**INFO ARTIKEL****Riwayat Artikel**

Diterima 7 Oktober 2020

Direvisi 30 Oktober 2020

Tersedia online 23 November 2020

* Email penulis korespondensi:
khoirotul.ummah@uinsby.ac.id

ABSTRAK

This study carries out the synthesis of vanillyl methyl ketone from eugenol through Wacker oxidation and anti-inflammatory activity test toward COX-1 and COX-2 through *in silico* analysis. Wacker oxidation proses were catalyzed by PdCl₂ and CuCl₂ using DMF solvent under the aerobic condition at room temperature for 48 hours. The synthesis product was purified by column chromatography and was characterized by NMR, IR and MS spectroscopy. By spectroscopic methods, characterization showed that vanillyl methyl ketone was formed with a yield of 45%, and vanillin (3%) was produced as a by-product. The anti-inflammatory activity of vanillyl methyl ketone was carried out by molecular docking toward COX-1 and COX-2 obtained from PDB. The analysis showed that the anti-inflammatory activity and selectivity toward COX-2 of vanillyl methyl ketone was higher than eugenol. This was shown by the low binding energy affinity and the number of hydrogen bonds formed between the vanillyl methyl ketone and the enzyme's active site.

Keywords: Eugenol, Wacker oxidation, vanillyl methyl ketone, anti-inflammatory, *in silico*

Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa vanilil metil keton dari eugenol melalui oksidasi Wacker serta dilakukan uji aktivitas antiinflamasi terhadap enzim COX-1 dan COX-2 melalui analisis *in silico*. Proses oksidasi Wacker dikatalisis oleh PdCl₂ dan CuCl₂ menggunakan pelarut DMF dalam kondisi aerob pada suhu ruang selama 48 jam. Senyawa hasil sintesis dipisahkan menggunakan kolom kromatografi dan dikarakterisasi menggunakan spektroskopi NMR, IR dan MS. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa senyawa vanilil metil keton telah terbentuk dengan randemen sebanyak 45% dan juga dihasilkan senyawa vanillin (3%) sebagai produk samping. Aktivitas antiinflamasi senyawa vanilil metil keton dilakukan dengan *docking* molekuler terhadap enzim COX-1 dan COX-2 yang diperoleh dari PDB. Hasil analisis menunjukkan bahwa aktivitas antiinflamasi dan selektivitas terhadap COX-2 pada senyawa vanilil metil keton lebih tinggi dibandingkan eugenol. Hal ini ditunjukkan melalui rendahnya afinitas energi pengikatan dan banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk antara vanilil metil keton dengan sisi aktif enzim.

Kata kunci: Eugenol, oksidasi Wacker, vanilil metil keton, antiinflamasi, *in silico*

1. Pendahuluan

Obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID) dikenal sebagai senyawa aktif farmakologis yang digunakan dalam mengatasi peradangan, nyeri, dan demam [1]. NSAID bekerja menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX-1 dan COX-2) dalam mengkatalisis pembentukan prostaglandin (mediator inflamasi) [1, 2, 3]. Enzim COX-1 secara konstitutif terdapat pada sebagian besar jaringan dan organ untuk mengkatalisis sintesis prostaglandin dalam regulasi fisiologis dan aktivitas seluler, sedangkan COX-2 distimulasi oleh sitokin, mitogen, dan endotoksin yang terinduksi pada sel inflamasi [4]. Berdasarkan mekanisme tersebut, efek antipiretik yang dihasilkan lebih efektif apabila dilakukan penghambatan terhadap enzim COX-2, sedangkan kemungkinan efek samping yang ditimbulkan akan lebih banyak terjadi pada penghambatan enzim COX-1 [5]. Secara umum obat-obat NSAID bekerja aktif dalam penghambatan aktivitas enzim COX-1 dan COX-2 [5, 6]. Penggunaan obat-obatan NSAID dalam jangka panjang juga menyebabkan efek samping seperti peradangan lambung, peningkatan resiko jantung dan hepatotoksik [7]. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang obat antiinflamasi yang aman dan selektif terhadap penghambatan enzim COX-2.

Penelitian antiinflamasi berbasis bahan alam telah banyak dilakukan untuk menemukan obat antiinflamasi dengan efek samping yang lebih kecil [8, 9]. Senyawa bahan alam yang berpotensi sebagai antiinflamasi diantaranya yaitu eugenol [10, 11]. Eugenol merupakan senyawa utama dalam minyak cengkeh (80-90%) dan tersedia melimpah di Indonesia [12]. Selain berpotensi sebagai antiinflamasi, eugenol juga memiliki sifat farmakologi sebagai antibakteri, antioksidan, dan analgesik [13, 15]. Struktur senyawa eugenol berupa fenil propana dengan gugus fungsi hidroksi, metoksi, dan olefin. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mentransformasi eugenol menjadi senyawa turunannya yang bernilai lebih tinggi seperti flavonoid, hidroksitirozol, metileugenol, dan bahan dasar polimer terbarukan [16, 17, 18, 19].

Kajian *in silico* terhadap senyawa-senyawa antiinflamasi menunjukkan bahwa adanya cincin aromatik pada senyawa ligan dapat meningkatkan interaksinya dengan sisi aktif enzim [20]. Selain meningkatkan aktivitas antiinflamasi, adanya gugus karbonil seperti mono keton atau diketon pada senyawa ligan dapat meningkatkan selektivitas inhibisinya terhadap COX-2 [21]. Dengan mentransformasi gugus olefin pada eugenol menjadi gugus keton diharapkan dapat meningkatkan aktivitasnya sebagai antiinflamasi. Gugus olefin dapat ditransformasi menjadi gugus keton melalui oksidasi Wacker menggunakan katalis paladium, air dan ko-oksidan [22]. Dalam reaksi oksidasi Wacker, katalis Pd(II) akan mengalami reduksi menjadi Pd(0) yang kemudian dapat dioksidasi kembali oleh ko-oksidan seperti CuCl_2 [23]. Oksidasi Wacker banyak digunakan dalam berbagai sintesis senyawa organik karena dianggap sebagai reaksi yang paling efisien dan spesifik dalam mengubah olefin terminal menjadi metil keton [24]. Konversi gugus keton yang dibentuk dapat dipengaruhi oleh struktur ligan, substrat dan senyawa lain yang ikut dalam reaksi [25]. Pelarut yang digunakan selama proses oksidasi juga berperan penting dalam terbentuknya produk yang dihasilkan. Pelarut yang berpotensi sebagai nukleofil seperti metanol dan etanol dapat menggantikan molekul H_2O dalam proses oksidasi Wacker sehingga menghasilkan produk yang bervariasi [26]. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan transformasi gugus olefin pada eugenol menjadi senyawa vanilil metil keton dan analisis aktivitas antiinflamasi melalui *docking* molekuler.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Eugenol diperoleh dari PT. Indesso Utama Kencana. Bahan kimia yang digunakan adalah PdCl_2 99% (Sigma Aldrich), CuCl_2 99% (Sigma Aldrich), dan gas oksigen (O_2) 95% (Oxycan). Pelarut yang digunakan yaitu dimetil formamida (DMF) p.a (Merck), diklorometana (DCM) p.a (Merck) dan n-heksana p.a (Merck). Kromatografi lapis tipis dilakukan menggunakan plat gel silika pra-dilapisi 60 F254 (ketebalan 0,25 mm) (Merck). Kromatografi kolom flash dilakukan menggunakan silika gel 60 (70-230 mesh) (Merck) dengan pelarut n-heksana dan diklorometana yang baru didestilasi.

Pada analisis *in silico*, molekul enzim COX-1 dan COX-2 pada manusia diperoleh dari *Protein Data Bank (PDB)* <https://www.rcsb.org> dengan kode COX-1 (ID: 5GMM) dan COX-2 (ID: 5GMN). Ligan diperoleh dari bank data <https://www.pubchem.com> dengan kode vanilil metil keton (CID: 17262) dan eugenol (CID: 3314). Simulasi *docking* molekuler dilakukan dengan menggunakan Microsoft Surface Laptop 2 core i5 dengan *Windows 10 Home*. Beberapa software yang digunakan adalah Discovery Studio Client 4.1, Autodock 4.2, Autodock Vina, PyMOL dan LigPlot.

2.2. Sintesis Senyawa Vanilil Metil Keton

Sebanyak 1,02 g (6 mmol) senyawa eugenol dilarutkan dalam 120 mL dimetil formamida (DMF) dan dimasukkan dalam labu alas bulat 250 mL. Selanjutnya, ditambahkan 12 mL H_2O ; 0,098 g (0,55 mmol) PdCl_2 dan 0,82 g (6 mmol) CuCl_2 kemudian bagian atas labu ditutup dengan balon yang berisi oksigen. Campuran tersebut diaduk menggunakan

pengaduk magnetik pada temperatur 25°C selama 48 jam dan proses reaksi dipantau menggunakan KLT dengan eluen n-heksana:diklorometana (3:7). Setelah reaktan habis, reaksi dihentikan dan diperoleh campuran produk berwarna coklat. Hasil reaksi diekstraksi menggunakan pelarut diklorometana (DCM) dan air dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya fasa organik (DCM) diekstraksi kembali dengan akuades (1:10) untuk menghilangkan sisa DMF dari reaksi tersebut. Fasa organik dipisahkan dan dilakukan evaporasi sehingga diperoleh campuran dua senyawa hasil reaksi. Campuran tersebut dipisahkan menggunakan kolom kromatografi dengan eluen n-heksana:diklorometana (3:7).

2.3. Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis

Karakterisasi senyawa hasil sintesis dilakukan menggunakan spektroskopi NMR, IR dan MS. Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ diukur pada Agilent DD2 dan JEOL ECA 500 MHz dengan pelarut *cloroform-d* (CDCl_3). Spektroskopi IR menggunakan spektrometer Alpha Bruker FTIR dan spektroskopi masa (MS) menggunakan (HRESIMS) Waters LCT Premiere XE.

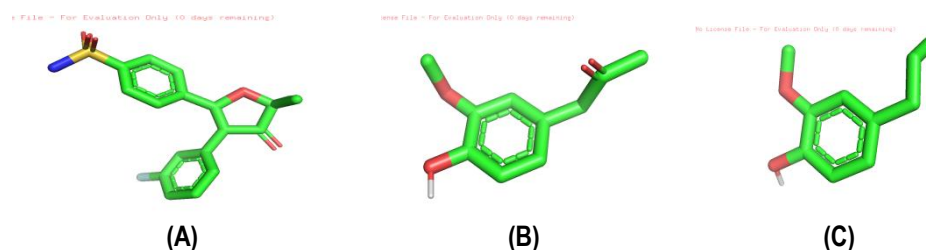
Senyawa vanilil metil keton, padatan berwarna kuning, 493 mg (45%), $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 6,88 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,70 (s, 1H), 5,63 (s, br, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,62 (s, 2H), 2,15 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 206,99, 146,67, 144,77, 126,01, 122,28, 114,57, 111,63, 55,91, 50,68, 29,04 ppm; IR (KBr): ν_{maks} 3435, 3002, 2934, 2838, 1708, 1601, 1518, 1431, 1271, 769 cm^{-1} ; HRESIMS ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$) dengan nilai (M-H) $^-$ data pengukuran m/z : 179,0707 dan data perhitungan m/z : 179,0708.

Senyawa vanilin, padatan berwarna kuning pucat, 30 mg (3%), $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 9,83 (s, 1H), 7,44 (dd, $J_1=5$ Hz, $J_2=1,7$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J=1,3$ Hz, 1H), 7,05 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 6,25 (s, br, 1H), 3,98 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 190,92, 151,71, 147,17, 129,93, 127,57, 114,41, 108,8, 56,16 ppm; IR (KBr): ν_{maks} 3182, 2941, 2842, 1671, 1587, 1514, 1467, 1428, 1271, 1207, 1153, 1027, 860, 731; HRESIMS ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) dengan nilai (M-H) $^+$ data pengukuran m/z : 153,0551 dan data perhitungan m/z : 153,0552.

2.4. Analisis in Silico

2.4.1. Persiapan Ligan dari Protein

Molekul enzim COX-1 dan COX-2 pada manusia diperoleh dari *Protein Data Bank (PDB)* <https://www.rcsb.org> dengan kode COX-1 (ID: 5GMM) dan COX-2 (ID: 5GMN). Ligan diperoleh dari bank data <https://www.pubchem.com> dengan kode vanilil metil keton (CID: 17262) dan eugenol (CID: 3314) yang ditunjukkan pada **Gambar 1**. Preparasi molekul enzim dan ligan dilakukan menggunakan perangkat lunak Discovery Studio Client 4.1. untuk mengganti ligan menjadi bentuk format PDB dan menghilangkan molekul air yang melekat pada enzim COX-1 dan COX-2. Preparasi selanjutnya dilakukan dengan Autodock 4.2 untuk menambahkan hidrogen polar, muatan dan menyimpan enzim serta ligan dalam format PDBQT. Selain itu, dengan *Autodock 4.2* juga dilakukan analisis ukuran *grid box* yang akan digunakan dalam proses *docking*.



Gambar 1. Struktur 3D ligan: (A) Ligan natif pada enzim COX-1 dan COX-2, (B) Vanilil metil keton, dan (C) Eugenol

2.4.2. Validasi Metode Docking Molekuler

Untuk mengetahui ketepatan posisi ligan dan *grid box* yang dipakai dalam proses *molecular docking*, maka dilakukan validasi dengan melakukan *redocking* antara ligan natif dengan enzim menggunakan Autodock Vina. Hasil *redocking* kemudian dianalisis menggunakan PyMOL untuk mengetahui nilai *root mean square deviation* (RMSD) antara ligan natif asal dari PDB dengan ligan natif hasil *redocking*. Metode *molecular docking* yang dilakukan dikatakan valid apabila nilai $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ [27].

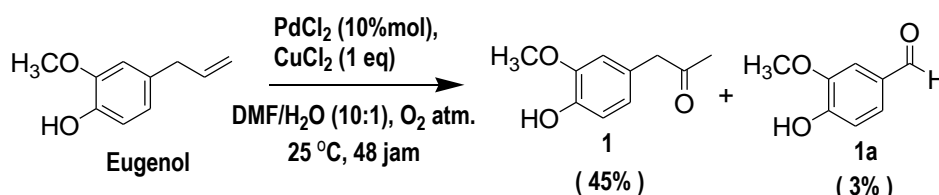
2.4.3. Molecular Docking

Docking molekuler antara ligan dan enzim dilakukan menggunakan Autodock Vina. Hasil *docking* dianalisis menggunakan PyMOL untuk melihat posisi ligan dalam *pocket* sisi aktif enzim. Selanjutnya interaksi antara ligan dengan enzim dianalisis menggunakan LigPlot.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Sintesis Senyawa Vanilil Metil Keton

Oksidasi eugenol menjadi vanilil metil keton dilakukan dengan pereaksi Wacker menggunakan katalis paladium klorida 10% mol (**Gambar 2**). Selama proses reaksi, Pd(II) akan mengalami reduksi menjadi Pd(0) sehingga digunakan ko-oksidan CuCl₂ untuk mengoksidasi kembali Pd(0) menjadi Pd(II). Mekanisme reaksi oksidasi Wacker (**Gambar 3**) diawali dengan pengikatan ion Cl⁻ oleh senyawa PdCl₂ membentuk PdCl₄, kemudian dilanjutkan dengan pergantian atom Cl dengan senyawa eugenol sehingga menjadi kompleks PdCl₃-eugenol. Dengan adanya molekul H₂O, maka atom Cl yang terikat pada paladium dapat digantikan oleh H₂O dan selanjutnya akan mengalami reaksi adisi oleh gugus hidroksi dari air [28]. Sesuai dengan aturan Markovnikov, regioselektivitas reaksi adisi dengan air cenderung akan masuk pada karbon yang lebih tersubstitusi yaitu karbon sekunder. Hal ini disebabkan oleh adanya efek hiperkonjugasi yang dapat menstabilkan karbokation. Mekanisme reaksi Wacker diakhiri dengan adanya penataan ulang ikatan membentuk gugus keton [29].



Gambar 2. Oksidasi Wacker pada senyawa eugenol, (**1**) vanilil metil keton, dan (**1a**) vanillin.

Senyawa hasil sintesis berupa campuran dua senyawa yang selanjutnya dipisahkan menggunakan kolom kromatografi dengan eluen diklorometana:n-heksana (7:3). Hasil pemisahan diperoleh senyawa **1** (vanilil metil keton) sebanyak 493 mg dengan rendemen sebesar 45%. Uji kemurnian dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan tiga sistem eluen yang berbeda yaitu diklorometana dengan R_f 0,43, n-heksana:etil asetat (7:3) dengan R_f 0,40 dan n-heksana:diklorometana (1:9) dengan R_f 0,35.

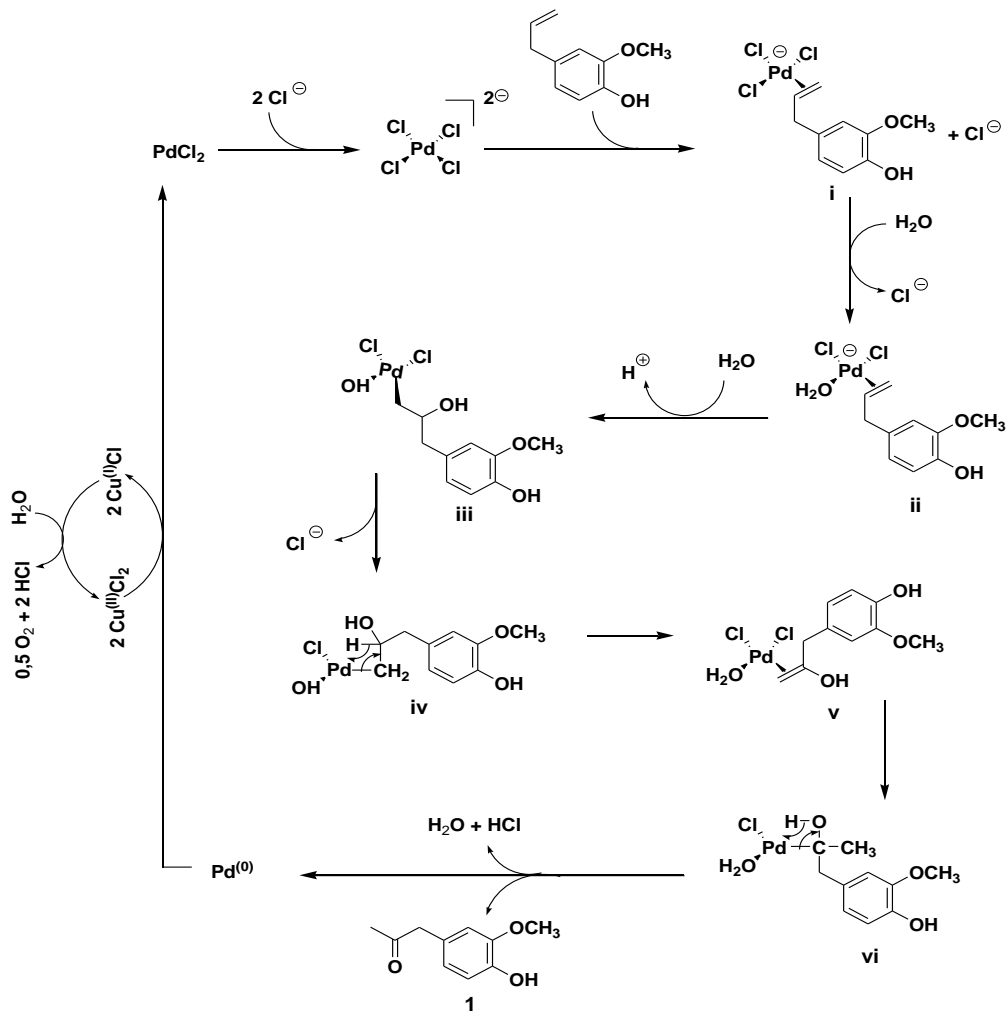
3.2. Identifikasi Senyawa Hasil Sintesis

Analisis struktur senyawa **1** menggunakan spektroskopi NMR menunjukkan adanya 10 sinyal karbon pada spektrum ¹³C-NMR yaitu satu sinyal karbonil (C=O), enam sinyal aromatik dan tiga sinyal alifatik. Adanya sinyal karbonil pada pergeseran 206,9 ppm menunjukkan bahwa sinyal tersebut adalah sinyal dari gugus keton yang tidak terkonjugasi [30]. Hal ini membuktikan bahwa terjadi reaksi oksidasi dari olefin menjadi keton. Data tersebut juga diperkuat dengan adanya sinyal metil (CH₃) dan metilen (CH₂) pada spektrum ¹H-NMR yang muncul pada pergeseran 2,15 ppm dan 3,62 ppm, dimana metil dan metilen tersebut merupakan alkil yang berikatan dengan gugus karbonil (keton). Pada ¹H-NMR masih terdapat tiga proton aromatik pada pergeseran 6,70–6,88 ppm serta sinyal metoksi yang merupakan substituen pada cincin aromatik muncul sebagai sinyal singlet pada pergeseran 3,88 ppm. Berdasarkan analisis tersebut, maka dapat diasumsikan bahwa senyawa **1** telah berhasil disintesis dari eugenol melalui reaksi oksidasi Wacker. Untuk memperkuat analisis gugus fungsi yang terdapat pada senyawa **1**, maka dilakukan pengukuran spektroskopi IR (**Gambar 4**).

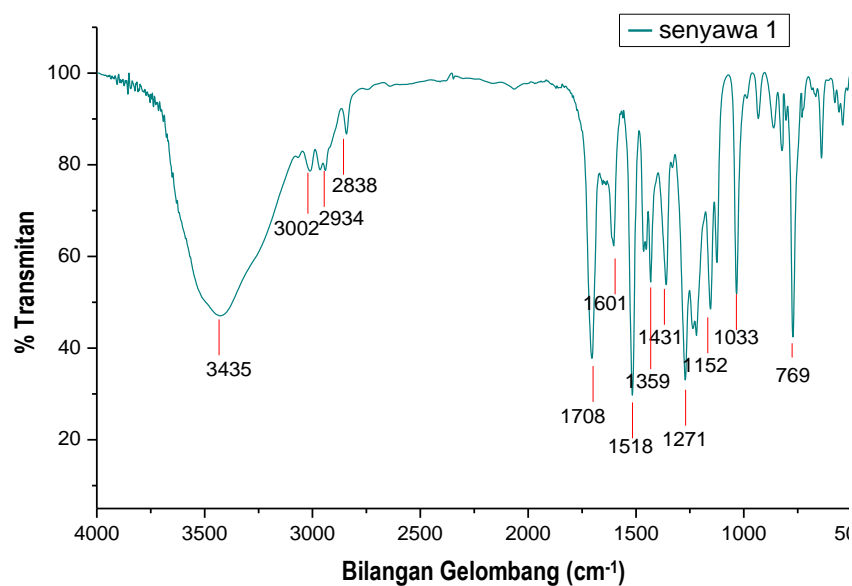
Pada spektrum IR, senyawa **1** memiliki pita serapan pada bilangan gelombang 3435 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi ulur dari gugus hidroksi (OH) pada fenol. Adanya gugus keton (C=O) hasil oksidasi Wacker dibuktikan dengan pita serapan yang muncul secara kuat pada bilangan gelombang 1708 cm⁻¹. Serapan keton tersebut berbeda dengan serapan gugus alkena monosubstitusi pada eugenol yang akan muncul secara lemah pada bilangan gelombang 1648 cm⁻¹ [31]. Serapan (C=C) aromatik muncul pada bilangan gelombang 1601, 1518, dan 1431 cm⁻¹ sedangkan gugus aril alkil eter (C-O-CH₃) muncul pada bilangan gelombang 1271 cm⁻¹. Pita serapan C-H sp² aromatik muncul pada bilangan gelombang 3002 cm⁻¹ dan C-H sp³ muncul pada bilangan gelombang 2934–2838 cm⁻¹.

Senyawa hasil samping oksidasi Wacker dari senyawa eugenol dihasilkan senyawa **1a** sebanyak 3%. Hasil analisis senyawa **1a** dengan spektroskopi NMR diperoleh delapan sinyal karbon pada ¹³C-NMR yaitu satu sinyal karbonil, enam sinyal aromatik dan satu sinyal alifatik. Berdasarkan jumlah atom karbonnya, dapat diidentifikasi bahwa terdapat pemutusan dua atom karbon pada eugenol menjadi senyawa **1a**. Sinyal karbonil pada senyawa **1a** muncul pada pergeseran 190,92 ppm, dimana sinyal tersebut merupakan sinyal dari gugus aldehid yang diperkuat dengan adanya sinyal proton aldehid yang muncul pada pergeseran 9,83 ppm. Tiga sinyal proton aromatik dan satu sinyal dari substituen metoksi masih muncul pada spektrum ¹H-NMR seperti pada senyawa **1**. Akan tetapi, sinyal proton aromatik pada senyawa **1a** memiliki pergeseran sinyal yang lebih *deshielding* dibandingkan dengan senyawa **1**. Hal ini disebabkan karena adanya pengaruh dari gugus aldehid yang merupakan gugus penarik elektron sehingga proton pada posisi orto

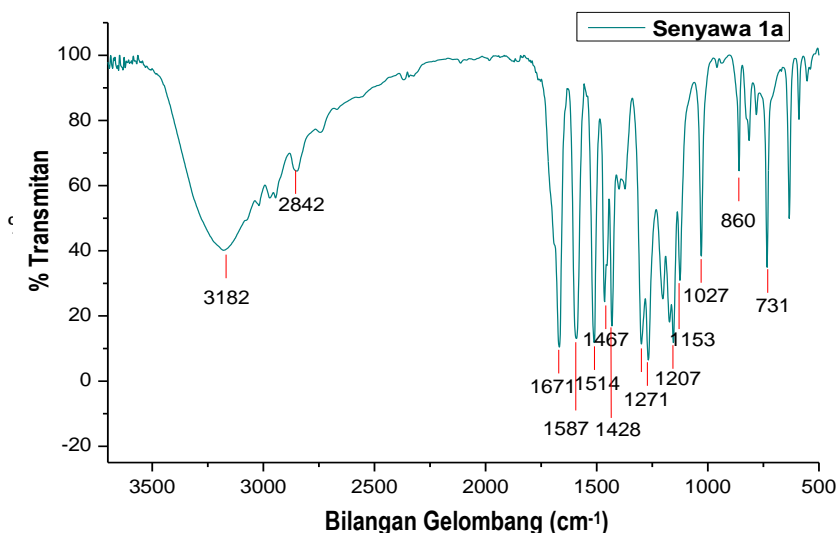
dan para terhadap gugus aldehyd tersebut memiliki kerapatan elektron yang lebih kecil [32]. Berdasarkan analisis tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa **1a** adalah senyawa vanilin.



Gambar 3. Mekanisme reaksi oksidasi Wacker pada senyawa eugenol.



Gambar 4. Spektrum IR senyawa 1.



Gambar 5. Spektrum IR senyawa 1a.

Untuk memperkuat hasil analisis NMR senyawa **1a**, dilakukan pula identifikasi gugus fungsi menggunakan spektroskopi IR (**Gambar 5**). Beberapa pita serapan gugus fungsi yang muncul pada senyawa **1a** identik dengan senyawa **1** yaitu terdapat gugus fenol yang muncul pada bilangan gelombang 3182 cm^{-1} , (C=C) aromatik pada bilangan gelombang 1587, 1514, dan 1467 cm^{-1} serta gugus eter pada substituen metoksi (C-O-CH₃) yang muncul pada bilangan gelombang 1271 cm^{-1} . Terdapat pita serapan gugus karbonil yang muncul secara kuat pada bilangan gelombang 1671 cm^{-1} , dimana nilai bilangan gelombang tersebut lebih rendah dari pada gugus keton pada senyawa **1**. Serapan karbonil pada senyawa **1a** tersebut diidentifikasi sebagai gugus aldehid (HC=O) yang terkonjugasi dengan aromatik [31]. Hasil analisis IR tersebut memperkuat analisis spektroskopi NMR bahwa senyawa **1a** merupakan senyawa vanilin. Terbentuknya senyawa vanilin pada oksidasi Wacker disebabkan karena terjadi isomerisasi alil benzena pada eugenol menjadi propenilbenzena yang diikuti dengan pemutusan secara oksidatif pada ikatan olefiniknya. Reaksi pemutusan ikatan olefin tersebut kemungkinan terjadi melalui proses mekanisme auto-oksidasi radikal [33].

3.3. Analisis *in Silico*

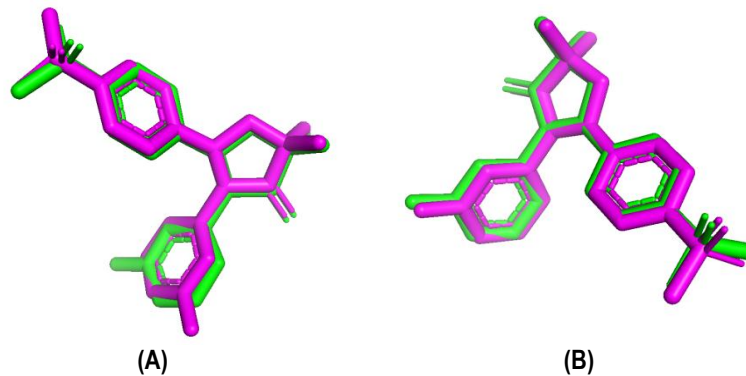
3.3.1. Validasi Metode Docking

Validasi metode *docking* dilakukan untuk mengetahui ketepatan posisi ligan dan *grid box* yang akan dipakai dalam proses *docking* molekuler [5]. Sebelum proses validasi, dilakukan preparasi dengan memisahkan struktur enzim COX-1 dan COX-2 dengan ligan natif menggunakan Autodock 4.2. Struktur enzim yang digunakan adalah rantai A dengan ligan natif inhibitorynya adalah 4-[3-(3-fluorophenyl)-5,5-dimethyl-4-oxidanylidene-furan-2-yl]benzenesulfonamide. Pada proses preparasi dilakukan pula analisis terhadap kompleks enzim dan ligan natif menggunakan LigPlot untuk menentukan residu aktif yang terlibat pada interaksi kompleks enzim-ligan. Residu aktif tersebut digunakan sebagai pertimbangan dalam penentuan ukuran *grid box*, dimana ukuran *grid box* yang digunakan harus meliputi semua residu aktif yang terlibat dalam interaksi 45 pada sisi aktif enzim [34]. Hasil pengukuran *grid box* menggunakan Autodock 4.2 pada enzim COX-1 adalah sebesar 16x20x18 dan enzim COX-2 adalah 16x22x20. Validasi metode *docking* dilakukan dengan *redocking* antara ligan natif dengan enzim menggunakan Autodock Vina. Metode *docking* yang digunakan dikatakan valid apabila nilai RMSD $\leq 2,0$ Å [27]. Hasil validasi *redocking* pada enzim COX-1 dan COX-2 (**Gambar 6**) terlihat bahwa ligan natif hasil *redocking* telah berhimpit dengan ligan natif dari PDB dengan nilai RMSD sebesar 1,589 Å pada COX-1 dan sebesar 0,923 Å pada COX-2. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran *grid box* yang digunakan pada validasi *docking* ini telah benar dan dapat digunakan untuk proses *docking* senyawa hasil sintesis [27].

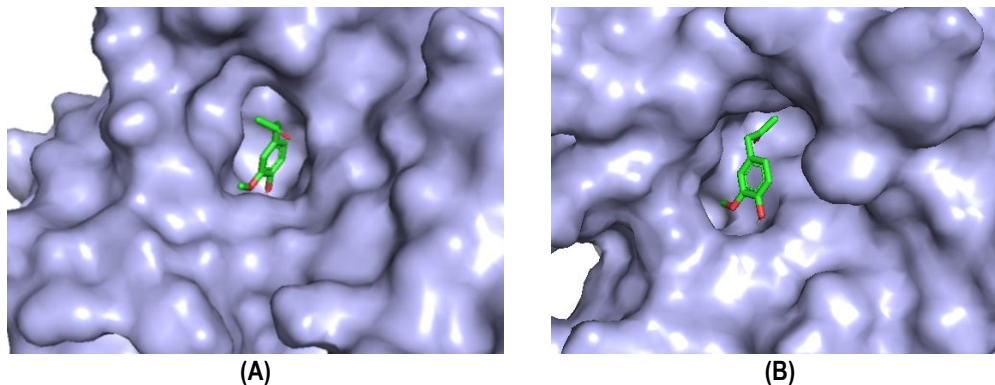
3.3.2. Docking Molekuler

Docking molekuler senyawa hasil sintesis (vanilil metil keton) dilakukan menggunakan Autodock Vina kemudian dianalisis menggunakan PyMOL dan LigPlot. Potensial aktivitas antiinflamasi yang diperoleh melalui *docking* molekuler dapat dilihat dari nilai afinitas energi pengikatan dan jumlah interaksi yang terjadi antara ligan dengan sisi aktif enzim (**Gambar 7**). Afinitas energi ikatan enzim-ligan merupakan energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan antara ligan dengan enzim. Semakin kecil energi yang dibutuhkan maka semakin stabil kompleks enzim-ligan tersebut [34]. Jumlah interaksi yang terjadi antara ligan dengan sisi aktif enzim seperti ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik juga mempengaruhi aktivitasnya. Banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk pada interaksi protein-ligan memberikan

kontribusi terhadap kestabilan struktur kompleks, dengan kata lain semakin banyak jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk maka akan semakin kompleks strukturnya [27]. Dalam interaksi protein-ligan, ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik juga mempengaruhi stabilitas ikatan antara ligan dan targetnya. Bila ikatan hidrogen yang cukup banyak disertai dengan interaksi hidrofobik, maka dapat dikatakan bahwa interaksi antara kedua molekul tersebut merupakan interaksi yang cukup kuat [35].



Gambar 6. Hasil validasi ligan natif pada enzim COX-1 (A) dan COX-2 (B). Ligan dari PDB ditunjukkan dengan warna hijau, sedangkan ligan hasil redocking ditunjukkan warna ungu.

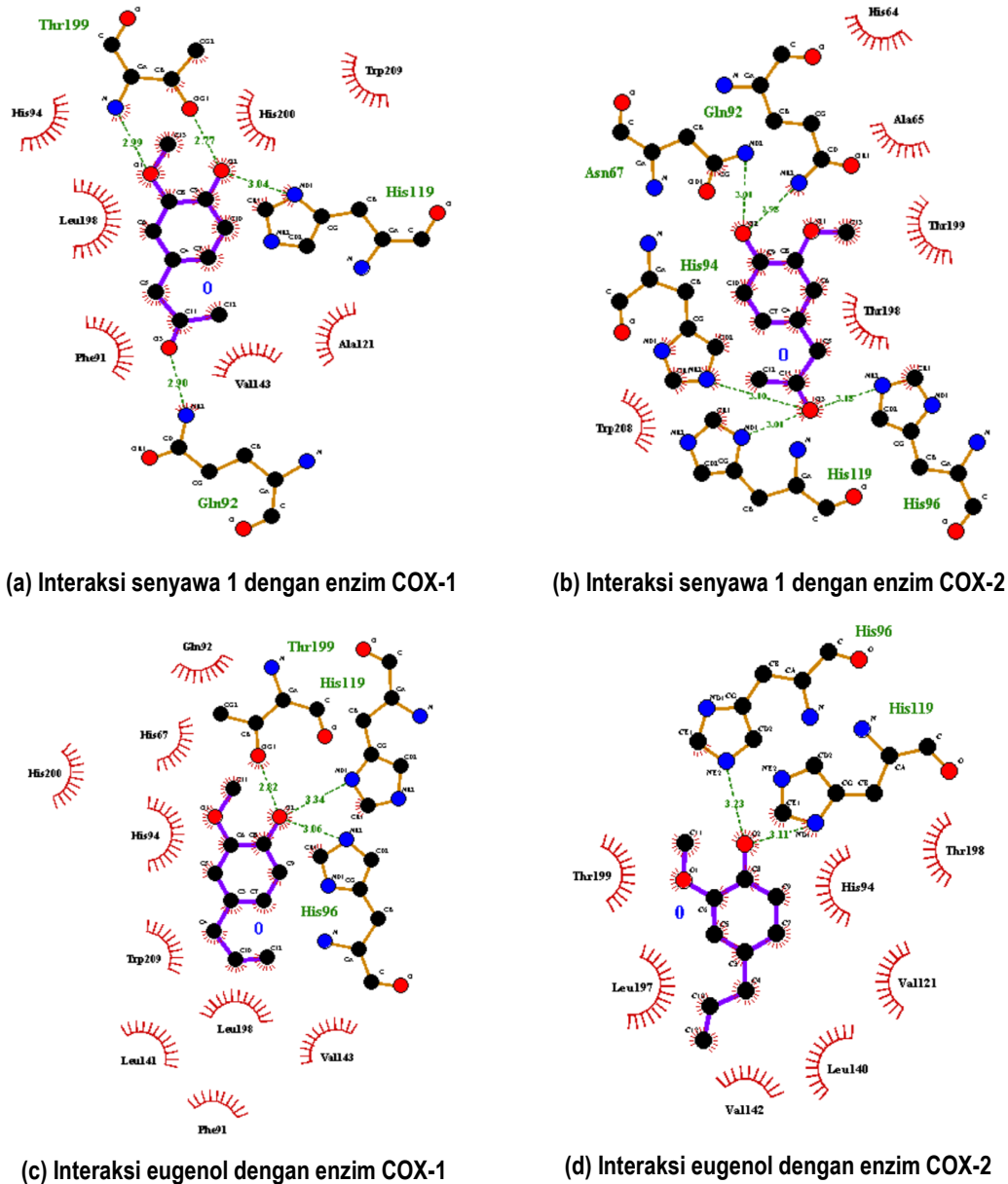


Gambar 7. Posisi senyawa vanilil metil keton pada sisi aktif enzim: (A) COX-1 dan (B) COX-2.

Hasil simulasi *docking* molekuler (**Gambar 8**) menunjukkan bahwa senyawa **1** (vanilil metil keton) dapat berinteraksi dengan sisi aktif enzim COX-1 melalui 4 ikatan hidrogen yaitu antara gugus keton pada senyawa **1** dengan hidrogen pada Gln92 dengan jarak ikatan sebesar 2,90 Å dan oksigen pada gugus metoksi berikatan hidrogen dengan Thr199 (2,99 Å). Gugus hidroksi (OH) pada senyawa **1** dapat berikatan hidrogen dengan dua residu asam amino pada sisi aktif enzim. Atom oksigen pada gugus hidroksi berikatan hidrogen dengan His119 (3,04 Å) sedangkan atom hidrogennya berikatan dengan atom oksigen pada gugus hidroksi Thr 199 (2,77 Å). Kompleks tersebut juga distabilkan dengan adanya interaksi hidrofobik antara senyawa **1** dengan residu Val43, Phe91, His94, Ala121, His200 dan Trp209 pada sisi aktif enzim COX-1. Kestabilan kompleks enzim-ligan diperkuat dengan nilai afinitas energi pengikatan yang rendah yaitu sebesar -5,9 kkal/mol (**Tabel.1**). Berdasarkan jumlah interaksi antara senyawa **1** dengan enzim COX-1, maka dapat dikatakan bahwa senyawa **1** memiliki aktivitas inhibisi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan eugenol, dimana pada senyawa eugenol hanya gugus hidroksi yang dapat berikatan hidrogen dengan sisi aktif enzim (**Gambar 8**). Atom oksigen pada gugus hidroksi eugenol berikatan hidrogen dengan 2 asam amino yaitu His96 (3,06 Å) dan His119 (3,34 Å), sedangkan atom hidrogennya berikatan dengan atom oksigen pada gugus hidroksi asam amino Thr199 (2,82 Å). Berdasarkan data tersebut juga terlihat bahwa adanya gugus keton pada senyawa **1** berkontribusi dalam interaksi enzim-ligan melalui ikatan hidrogen. Dengan kata lain, keberadaan gugus keton pada senyawa **1** dapat meningkatkan kestabilan kompleks enzim-ligan sehingga dapat meningkatkan aktivitas inhibisi terhadap enzim COX-1 [21].

Gugus keton pada senyawa **1** (vanilil metil keton) juga berperan penting dalam interaksinya dengan sisi aktif enzim COX-2. Pada **Gambar 8** terlihat bahwa gugus keton pada senyawa **1** dapat berikatan hidrogen dengan 3 asam amino yaitu His94 (3,10 Å), His96 (3,18 Å), dan His119 (3,01 Å). Selain gugus keton, gugus metoksi pada senyawa **1** juga dapat berikatan hidrogen dengan 2 residu asam amino, Asn67 (3,01 Å) dan Gln92 (2,98 Å), serta diperkuat dengan beberapa interaksi hidrofobik dengan asam amino His64, Ala65, Thr198, Thr199 dan Trp208 (**Tabel 1**). Seperti halnya pada inhibisi enzim COX-1, aktivitas inhibisi senyawa **1** terhadap COX-2 juga lebih tinggi dibandingkan eugenol yang dibuktikan dengan jumlah ikatan hidrogen pada senyawa **1** lebih banyak dari pada eugenol. Eugenol hanya memiliki dua ikatan

hidrogen melalui atom oksigen pada gugus hidroksi (OH) dengan atom hidrogen pada residu asam amino His96 (3,23 Å) dan His119 (3,11 Å). Dalam hal ini, adanya gugus keton pada senyawa 1 berkontribusi dalam peningkatan kompleksitas enzim-ligan, begitu pula dengan aktivitas inhibisi terhadap enzim COX-2. Tingginya potensial inhibisi senyawa 1 terhadap COX-2 juga didukung dengan nilai afinitas energi pengikatan yang lebih rendah dibandingkan dengan eugenol yaitu sebesar -6,2 kkal/mol (**Tabel 1**).



Gambar 8. Interaksi senyawa ligan dengan enzim COX-1 dan COX-2.

Secara keseluruhan hasil *docking* molekuler senyawa 1 terhadap enzim COX-1 dan COX-2 menunjukkan bahwa keberadaan gugus keton pada senyawa 1 dapat meningkatkan aktivitas inhibitorynya melalui ikatan hidrogen dengan sisi aktif enzim. Oleh karena itu, potensial inhibisi senyawa 1 terhadap kedua enzim tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan eugenol, begitu pula aktivitas antiinflamasinya. Berdasarkan perbandingan hasil inhibisi senyawa 1 terhadap COX-1 dan COX-2, terlihat bahwa senyawa vanilil metil keton juga memiliki selektivitas inhibitor yang lebih tinggi terhadap enzim COX-2 dibandingkan COX-1. Selektivitas tersebut dibuktikan dengan nilai afinitas energi pengikatan pada enzim COX-2 yang lebih rendah dari pada COX-1. Hal tersebut juga diperkuat dengan jumlah ikatan hidrogen antara senyawa 1 dengan sisi aktif enzim COX-2 lebih banyak dibandingkan COX-1 (**Gambar 5**). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa transformasi gugus olefin pada senyawa eugenol menjadi gugus keton (vanilil metil keton) dapat meningkatkan aktivitasnya sebagai antiinflamasi serta selektivitas inhibisinya terhadap enzim COX-2.

Tabel 1. Hasil *Docking* Senyawa Eugenol dan Vanilil Metil Keton

Enzim	COX-1		COX-2	
Senyawa	Eugenol	Vanilil metil keton	Eugenol	Vanilil metil keton
Energi (kkal/mol)	-5,9	-5,9	-5,7	-6,2
Ikatan hidrogen	His96 (3,06 Å), His119 (3,34 Å), Thr199 (2,82 Å)	Gln92 (2,90 Å), His119 (3,04 Å), Thr199 (2,77 Å), Thr199 (2,99 Å)	His96 (3,23 Å), His119 (3,11 Å)	Asn67 (3,01 Å), Gln92 (2,98 Å), His94 (3,10 Å), His96 (3,18 Å), His119 (3,01 Å)
Interaksi hidrofobik	Leu41, Val43, His67, Phe91, Gln92, His94, Leu198, His200, Trp209	Val43, Phe91, His94, Ala121, His200, Trp209	Val42, His94, Val121, Leu140, Leu197, Thr198, Thr199	His64, Ala65, Thr198, Thr199, Trp208

4. Kesimpulan

Oksidasi Wacker pada senyawa eugenol menghasilkan senyawa vanilil metil keton dengan randemen 45% dan produk samping berupa vanillin sebanyak 3%. Berdasarkan analisis *in silico*, senyawa vanilil metil keton memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan eugenol dan memiliki selektivitas yang lebih tinggi terhadap enzim COX-2 dibandingkan COX-1. Hal ini ditunjukkan melalui rendahnya afinitas energi pengikatan dan banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk antara vanilil metil keton dengan sisi aktif enzim. Analisis lebih lanjut melalui uji *in vitro* dan *in vivo* sangat dibutuhkan untuk validasi hasil analisis *in silico*.

Daftar Pustaka

- [1] P. G. Conaghan, "A Turbulent Decade for NSAIDs: Update on Current Concepts of Classification, Epidemiology, Comparative Efficacy, and Toxicity", *Rheumatology International*, vol. 32, no. 6, pp. 1491–502, 2012.
- [2] J. A. Mitchell, S. Larkin, & T. J. Williams, "Cyclooxygenase-2: Regulation and Relevance in Inflammation", *Biochemical Pharmacology*, vol. 50, no. 10, pp. 1535-1542, 1995.
- [3] A. A. M. Abdel-Aziz, A. Angeli, A. S. El-Azab, M. E. A. Hammouda, M. A. El-Sherbeny, & C. T. Supuran, "Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Sulfonamides and Carboxylates Incorporating Trimellitimidates: Dual Cyclooxygenase/Carbonic Anhydrase Inhibitory Actions", *Bioorganic Chemistry*, vol. 84, pp. 260–268, 2019.
- [4] P. P. Kapupara, S. P. Dholakia, V. P. Patel, & B. N. Suhagia, "Design, Synthesis and Pharmacological Screening of 4-Amino-5-pyrimidinecarbonitriles as Potential Anti-inflammatory Agents", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 2, no. 3, pp. 287-294, 2010.
- [5] R. D. Kamble, R. J. Meshram, S. V. Hese, R. A. More, S. S. Kamble, R. N. Gacche, & B. S. Dawane, "Synthesis and *In Silico* Investigation of Thiazoles Bearing Pyrazoles Derivatives as Anti-Inflammatory Agents" *Computational Biology and Chemistry*, vol. 61, pp. 86-96, 2016.
- [6] R. Ottana, R. Maccari, M. L. Barreca, G. Bruno, A. Rotondo, A. Rossi, G. Chiricosta, R. Di Paola, L. Sautebin, S. Cuzzocrea, & M. G. Vigorita, "5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: Design and Synthesis of Novel Anti-inflammatory Agents", *Bioorganic and Medical Chemistry*, vol. 13, no. 13, pp. 4243-4252, 2005.
- [7] S. Bindu, S. Mazumder, & U. Bandyopadhyay, "Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and Organ Damage: A Current Perspective", *Biochemical Pharmacology*, vol. 180, no. 114147, 2020.
- [8] P. Apridamayanti, F. Sanera, & Robiyanto, "Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Karas (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)", *Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 5, no. 3, pp. 152-158, 2018.
- [9] O. K. Nwosu, M. Keskin, H. Lohani, C. Egbuna, & S. Z. Haider, "Bioactive Lead Compounds and Molecular the Development of Antiinflammatory Drugs", *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, pp. 317-331, 2020.
- [10] J.-H Lee, H.-H. Lee, K.-N. Kim, & K.-M. Kim, "Cytotoxicity and Anti-inflammatory Effects of Zinc Ions and Eugenol during Setting of ZOE in Immortalized Human Oral Keratinocytes Grown as Three-dimensional Spheroids", *Dental Materials*, vol. 32, no. 5, pp. e93-e104, 2016.

- [11] X. Huang, Y. Liu, Y. Lu, & C. Ma, "Anti-inflammatory Effects of Eugenol on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Reaction in Acute Lung Injury via Regulating Inflammation and Redox Status", *International Immunopharmacology*, vol. 26, no. 1, pp. 265–271, 2015.
- [12] H. Prianto, R. Retnowati, & U. P. Juswono, "Isolasi dan Karakterisasi dari Minyak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Kering Hasil Distilasi Uap", *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya*, vol. 1, no. 2, pp. 269–275, 2013.
- [13] T. S. Kaufman, "The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-organic Synthesis and a Convenient Precursor toward Bio-based Fine Chemicals", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 26, no. 6, pp. 1055-1085, 2015.
- [14] W. Qian, Z. Sun, T. Wang, M. Yang, M. Liu, M., J. Zhang, & Y. Li "Antimicrobial Activity of Eugenol against Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and Its Effect on Biofilms", *Microbial Pathogenesis*, vol. 139, 2020.
- [15] J. Bonilla, T. Poloni, R. V. Lourenço, & P. J. A. Sobral, "Antioxidant Potential of Eugenol and Ginger Essential Oils with Gelatin/Chitosan Films", *Food Bioscience*, vol. 23, pp. 107-114, 2018.
- [16] J. Towaha, "The Benefits of Cloves Eugenol in Various Industries in Indonesia", *Majalah Perspektif Review Penelitian Tanaman Industri*, vol. 11, no. 2, pp. 79–90, 2012.
- [17] W. Wibowo, W. P. Suwarso, T. Utari, & H. Purwaningsih, "Aplikasi Reaksi Katalisis Heterogen untuk Pembuatan Vanilin Sintetik (3-hidroksi-2-metoksibenzaldehid) dari Eugenol (4-alil-2-metoksifenol) Minyak Cengkeh", *Makara Sains*, vol. 6, no. 3, pp. 142-148, 2002.
- [18] D. Deffieux, P. Gossart, & S. Quideau, "Facile and Sustainable Synthesis of the Natural Antioxidant Hydroxytyrosol", *Tetrahedron Letters*, vol. 55, no. 15, pp. 2455–2458, 2014.
- [19] B. G. Harvey, A. J. Guenther, G. R. Yandek, L. R. Cambrea, H. A. Meylemans, L. C. Baldwin, & J. T. Reams, "Synthesis and Characterization of a Renewable Cyanate Ester/Polycarbonate Network Derived from Eugenol", *Polymer*, vol. 55, no.20, pp. 5073–5079, 2014.
- [20] R. Heiran, S. Sepehri, A. Jarrahpour, C. Digiorgio, H. Douafer, J. M. Brunel, A. Gholami, E. Riazimontazer, & E. Turos, "Synthesis, Docking and Evaluation of *in Vitro* Anti-inflammatory Activity of Novel Morpholine Capped β -Lactam Derivatives", *Bioorganic Chemistry*, vol. 102, 2020.
- [21] L. Arshad, M. A. Haque, S. N. A. Bukhari, & I. Jantan, "An Overview of Structure–activity Relationship Studies of Curcumin Analogs as Antioxidant and Anti-inflammatory agents", *Future Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 6. 605-626, 2017.
- [22] J. R. McCombs, B. W. Michel, & M. S. Sigman, "Catalyst-controlled Wacker-type Oxidation of Homoallylic Alcohols in the Absence of Protecting Groups", *Journal of Organic Chemistry*, vol. 76, no. 9, pp. 3609–3613, 2011.
- [23] J. M. Takacs, & X. Jiang, "The Wacker Reaction and Related Alkene Oxidation Reactions", *Current Organic Chemistry*, vol. 7, no. 4, pp. 369-396, 2003.
- [24] T. Mitsudome, T. Umetani, K. Mori, T. Mizugaki, K. Ebitani, & K. Kaneda, "Highly Efficient Wacker Oxidation Catalyzed by Heterogeneous Pd Montmorillonite under Acid-free Conditions", *Tetrahedron Letters*, vol. 47, no. 9, pp. 1425–1428, 2006.
- [25] H. R. Darabi, M. Mirzakhani, K. Aghapoor, K. Jadidi, L. Faraji, & N. Sakhaee, "A Structure-activity Relationship Study on the Wacker Oxidation of Stilbenes at Ambient Condition", *Journal of Organometallic Chemistry*, vol. 740, pp. 131-134, 2013.
- [26] M. Cox & G. Klass, "Synthesis By-products from the Wacker Oxidation of Safrole in Methanol using *p*-Benzoquinone and Palladium Chloride", *Forensic Science International*, vol. 164, no.2-3, pp. 138-147, 2006.
- [27] W. F. de Azevedo Jr., *Docking Screens for Drug Discovery*. New York: Humana Press, 2019.
- [28] H. Eshtiagh-Hosseini, S. A. Beyramabadi, A. Morsali, & M. R. Housaindokht, "O-H Bond Cleavage Step of the Wacker Process: A DFT study", *Journal of Molecular Structure THEOCHEM*, vol. 941, no. 1, pp. 138–143, 2010.
- [29] T. V. Baiju, E. Gravel, E. Doris, & I. N. N. Namboothiri, "Recent Developments in Tsuji-Wacker Oxidation", *Tetrahedron Letters*, vol. 57, no. 36, pp. 3993-4000, 2016.
- [30] P. Y. Bruice, *Organic Chemistry*, 4th Ed. New York: Prentice Hall, 2003.
- [31] R. M. Silverstein, F. X. Webster, & D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th Ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2005.
- [32] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, & J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 4th Ed. California: Brooks/Cole, 2009.
- [33] L. A. Parreira, L. Menini, J. C. da Cruz Santos, & E. V. Gusevskaya, "Palladium-catalyzed Aerobic Oxidation of Naturally Occurring Allylbenzenes as a Route to Valuable Fragrance and Pharmaceutical Compounds", *Advanced Synthesis and Catalysis*, vol. 352, no.9, pp. 1533-1538, 2010.

- [34] T. Joshi, P. Sharma, T. Joshi & S. Chandra, "In Silico Screening of Anti-inflammatory Compounds from Lichen by Targeting Cyclooxygenase-2", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 38, no. 12, pp. 3544-3562, 2019.
- [35] R. Patil, S. Das, A. Stanley, L. Yadav, A. Sudhakar, & A. K. Varma, "Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing", *Plos One*, vol. 5, no. 8, pp. e12029, 2010.