



## Pakis Kinca (*Nephrolepis Cordifolia* (L) C. Presl) Sebagai Inhibitor Nitric Oxide Synthase

Elvina Astria Agustin<sup>1</sup>, Noor Annisa Rizkiyah<sup>2</sup> dan Samsul Hadi<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Prodi Farmasi, FMIPA, Universitas Lambung Mangkurat

e-mail: [elvinaastria18@gmail.com](mailto:elvinaastria18@gmail.com), [annisarizkiyah2@gmail.com](mailto:annisarizkiyah2@gmail.com), [samsul.hadi@ulm.ac.id](mailto:samsul.hadi@ulm.ac.id)

(\*e-mail: [samsul.hadi@ulm.ac.id](mailto:samsul.hadi@ulm.ac.id))

### Abstrak

Nitric oxide (NO) adalah molekul kecil, dan dihasilkan dari asam amino L-arginine (L-Arg) oleh tiga enzim nitric oxide synthase (NOS). Kadar kecil NO didalam darah dikaitkan dengan hipertensi, impotensi, aterosklerosis, dan penyakit kardiovaskular, sedangkan kelebihan NO menyebabkan peradangan, artritis reumatoid, penyakit radang usus, diabetes tipe imun, stroke, kanker, trombosis, dan infeksi. Metode penelitian ini menggunakan metode docking dengan software Autodock vina model rigid docking. Sennyawa yang digunakan berasal dari *Nephrolepis Cordifolia*. Visualisasi data hasil doking menggunakan Discovery studio. Analisis data menggunakan kombinasi energi Gibbs dan terjadinya ikatan hidrogen. Hasil diperoleh skor doking dari senyawa *Nephrolepis cordifolia* terhadap enzim Nitric Oxide Synthase. Energi gibbs terendah diperoleh oleh senyawa  $\beta$ -sitosterol yaitu -9.4270 kcal/mole. Dan ikatan yang terbentuk adalah ikatan Hidrofob. Senyawa fern-9(11)-ene dan  $\beta$ -ionone adalah hidrofob. Oleanolic acid mampu membentuk ikatan hidrogen dengan residu Arg199 dan Met 120. Benzyl butyl phthalate membentuk ikatan hidrogen dengan CYS200 dan TRP372. Ligand native (*omega*-imidazolyl-decanoic acid) mampu membentuk ikatan hidrogen dengan Arg199 dan TYR 489. Kesimpulan senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor nitric oxide synthase adalah Oleanolic acid dan Benzyl butyl phthalate.

**Kata kunci:** doking, NOS, Oleanolic acid

### Abstract

Nitric oxide (NO) is a small molecule, and is produced from the amino acid L-arginine (L-Arg) by three nitric oxide synthase (NOS) enzymes. Low levels of NO in the blood are associated with hypertension, impotence, atherosclerosis, and cardiovascular disease, while excess NO causes inflammation, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, immune type diabetes, stroke, cancer, thrombosis, and infection. This research method uses a docking method with Autodock Vina rigid docking model software. The compound used comes from *Nephrolepis Cordifolia*. Visualization of docking data using Discovery Studio. Data analysis uses a combination of Gibbs energy and the occurrence of hydrogen bonds. The results obtained were docking scores from the *Nephrolepis cordifolia* compound against the Nitric Oxide Synthase enzyme. The lowest GIBS energy was obtained by the  $\beta$ -sitosterol compound, namely -9.4270 kcal/mole. And the bonds formed are hydrophobic bonds. The compounds fern-9(11)-ene and  $\beta$ -ionone are hydrophobic. Oleanolic acid is able to form hydrogen bonds with residues Arg199 and Met 120. Benzyl butyl phthalate forms hydrogen bonds with CYS200 and TRP372. The native ligand (*omega*-imidazolyl-decanoic acid) is able to form hydrogen bonds with Arg199 and TYR

489. *Conclusion: The compounds that have the potential to act as nitric oxide synthase inhibitors are Oleanolic acid and Benzyl butyl phthalate.*

**Keywords:** *docking, NOS, Oleanolic acid*

## 1. Pendahuluan

Nitric oxide (NO) adalah molekul kecil, dan dihasilkan dari asam amino L-arginine (L-Arg) oleh tiga enzim nitric oxide synthase (NOS). Isozim NOS endotel (eNOS) dan neuronal (nNOS) diekspresikan secara konstitutif dan diatur untuk memproduksi NO, vasodilatasi, termoregulasi, perlindungan saraf, dan fungsi endokrin. Isozim NOS terinduksi (iNOS) yang tidak sensitif terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  diekspresikan sebagai respons terhadap sitokin atau patogen, dan menghasilkan NO dengan kecepatan tinggi untuk membunuh bakteri, virus, dan sel tumor [1]. Kadar kecil NO didalam darah yang diproduksi oleh eNOS dan nNOS dikaitkan dengan hipertensi, impotensi, aterosklerosis, dan penyakit kardiovaskular, sedangkan kelebihan NO dari iNOS telah menyebabkan peradangan, artritis reumatoid, penyakit radang usus, diabetes tipe imun, stroke, kanker, trombosis, dan infeksi. Produksi NO yang berlebihan oleh iNOS dan nNOS juga dikaitkan dengan gangguan neurodegeneratif termasuk penyakit Parkinson dan Alzheimer, serta multiple sclerosis. Oleh karena itu, pengembangan inhibitor spesifik iNOS sangat diinginkan [2].

Ketiga isozim NOS berbagi arsitektur modular yang sama dan situs aktif yang dilestarikan. Modul oksigenase katalitik N-terminal (NOSox) mengikat kofaktor heme dan (6R)-5,6,7,8-tetrahydro L-biopterin (H4B), substrat L-Arg, dan ion seng struktural melintasi antarmuka dimer. Setelah pengikatan calmodulin16, NOSox menerima elektron dari modul reduktase terminal-C. Konservasi asam amino yang hampir lengkap dan kesamaan struktural di antara tiga situs aktif isozim NOS menghadirkan tantangan yang signifikan untuk desain inhibitor spesifik isozim [3]. Selain itu, karena ketersediaan NO dikontrol pada tingkat sintesis untuk pensinyalan atau sitotoksitas, isozim NOS untuk mengatasi tantangan dalam merancang inhibitor spesifik isozim meskipun terdapat kantong pengikat yang dilestarikan [4].

Sebuah penelitian *Nephrolepis cordifolia* menemukan bahwa asam oleanolic berbahan dasar ekstrak tumbuhan memiliki kemampuan antibakteri terhadap enterococci yang resisten terhadap vankomisin, dengan MIC 8 g/ml terhadap resisten vankomisin enterokokus [5]. Asam oleanolic juga menghambat pertumbuhan *Streptococcus pneumoniae* dan *Staphylococcus aureus* (MRSA) yang resisten terhadap metisilin. Fern-9 (11)-ene ditemukan sensitif terhadap bakteri gram negatif kecuali *E. coli* [6], sangat rentan terhadap *Salmonella typhi*, dan cukup kuat terhadap *Pseudomona aeruginosa*. Satu studi percobaan tentang aktivitas antibakteri dan antibiofilm eugenol terhadap *Vibrio parahaemolyticus* menunjukkan sifat antibiofilm eugenol yang kuat terhadap lingkungan dan klinis isolat bakteri resisten multiobat *Vibrio parahaemolyticus* dan konsentrasi 0,1 persen eugenol mampu menurunkan biofilm sebesar 3 dan 2,5 CFU/cm<sup>2</sup> terhadap klinis dan isolat lingkungan, masing-masing. Berdasarkan uraian diatas maka *Nephrolepis cordifolia* berpotensi sebagai *Inhibitor Nitric Oxide Synthase* [7].

## 2. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode docking dengan software Autodock vina model rigid docking. Sennyawa yang digunakan berasal dari *Nephrolepis Cordifolia*. Visualisasi data hasil docking menggunakan Discovery studio. Analisis data menggunakan kombinasi energi Gibbs dan terjadinya ikatan hidrogen.

**3. Hasil dan Pembahasan**

iNOS<sub>ox</sub> dan eNOS<sub>ox</sub>, mode pengikatan untuk aminopyridine yang cukup selektif sangat berbeda meskipun struktur protein keseluruhan dan situs aktifnya sama. Inti inhibitor aminopyridine berikatan serupa di kantong heme situs aktif kedua isozim [8]. Dalam eNOS, ikatan hidrogen bidentat ke situs aktif Glu mengikat inti aminopiridin hampir sejajar dengan bidang heme dan menempatkan ekor besar inhibitor di antara heme propionat eNOS<sub>ox</sub>. Ikatan hidrogen Tyr dan Arg invarian dengan Gln, sehingga mencegah interaksi hidrofobiknya dengan ekor inhibitor. Akibatnya, kompleks eNOS dengan senyawa 9 menunjukkan konformasi tertutup Gln dan kantong spesifisitas Gln tidak teramati. Sebaliknya, kompleks iNOS dengan senyawa menunjukkan konformasi Gln-terbuka yang memungkinkan ekor inhibitor berikatan dalam kantong spesifisitas Gln. Tidak hanya kulit pertama Gln dan Arg, tetapi juga kulit kedua Asn, menghadirkan konformasi berbeda pada kedua kompleks tersebut [9].

**Tabel 1. Skor docking**

Nama	skor docking (kcal/mol)
β-sitosterol	-9.4270
fern-9(11)-ene	-9.4270
β-ionone	-6.098
benzyl butyl phthalate	-8.705
oleanolic acid	-8.705
Myristic acid	-6.098
Eugenol	-6.098
Ligand native	-6.7930

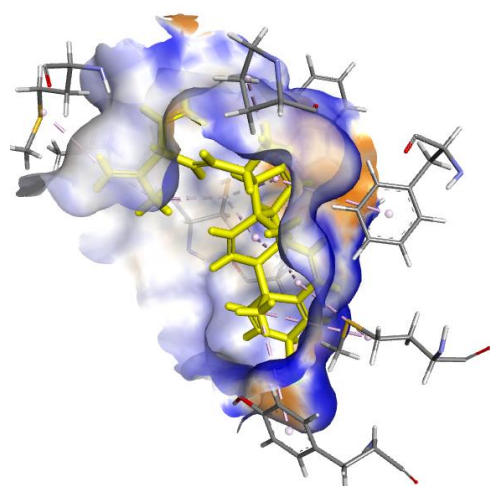
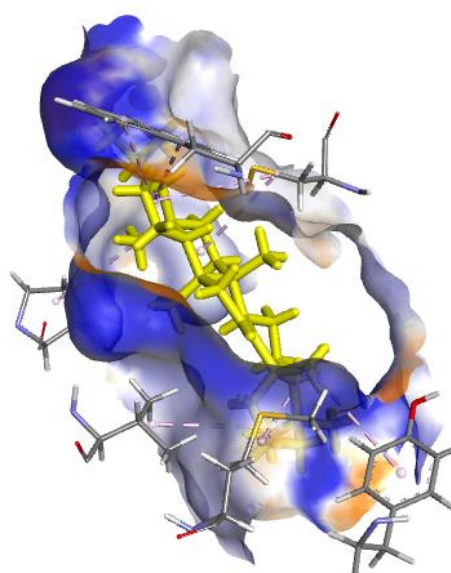
**Tabel 2. Residu yang terlibat dalam interaksi**

Nama	Residu yang terlibat interkasi
β-sitosterol	LEU 125 TRP 194 ALA 197 PRO 198 ARG 199 A CYS 200 A ILE 201 A GLY 202 A PRO 350 A VAL 352 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TRP 372 A TYR 373 A MET 374 A GLU 377 A PHE 488 A TYR 489 A TYR 491
fern-9(11)-ene	A TRP 194 A ARG 199 A CYS 200 A ILE 201 A GLY 202 A GLN 205 A SER 242 A GLN 263 A PRO 350 A VAL 352 A ASN 354 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TRP 372 A TYR 373 A GLU 377 A TYR 491
β-ionone	A TRP 194 A ALA 197 A PRO 198 A ARG 199 A CYS 200 A VAL 352 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TYR 489 A TYR 491
benzyl butyl phthalate	A LEU 125 A TRP 194 A ALA 197 A PRO 198 A ARG 199 A CYS 200 A GLY 202 A GLN 205 A LEU 209 A SER 242 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TRP 372 A PHE 488 A TYR 489 A TYR 491
oleanolic acid	A MET 120 A THR 121 A TRP 194 A ARG 199 A CYS 200 A ALA 262 A GLN 263 A PRO 350 A VAL 352 A ASN 354 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TRP 372 A GLU 377 A TYR 491

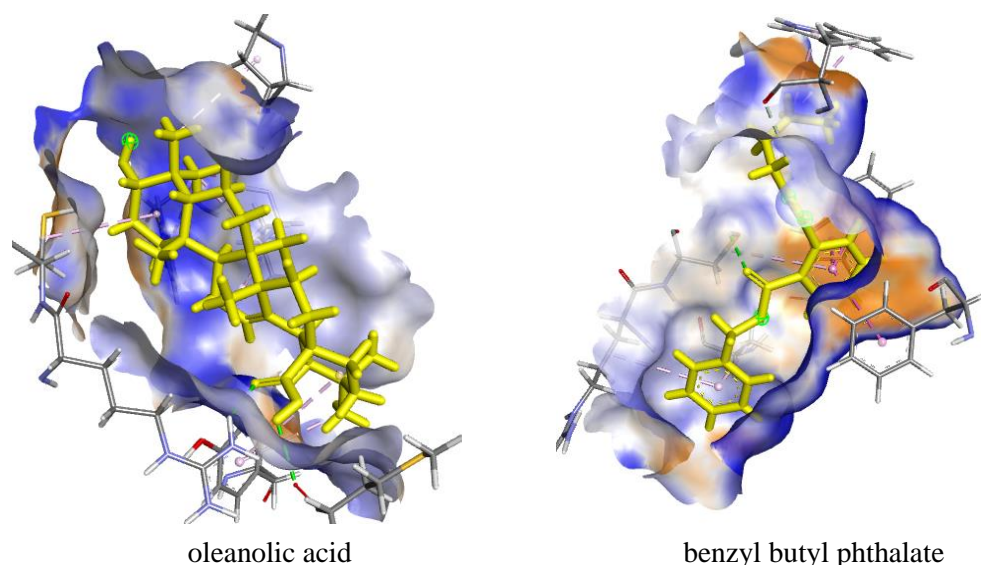
Myristic acid	A TRP 194 A ALA 197 A PRO 198 A ARG 199 A CYS 200 A SER 242 A VAL 352 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TRP 372 A TY???9 A TY???1
Eugenol	A TRP 194 A ALA 197 A CYS 200 A GLY 202 A PRO 350 A VAL 352 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A TRP 372 A TYR 373 A GLU 377 A TYR 489
Ligand native	A LEU 125 A TRP 194 A ALA 197 A PRO 198 A ARG 199 A CYS 200 A PRO 350 A ALA 351 A VAL 352 A MET 355 A PHE 369 A ASN 370 A GLY 371 A PHE 488 A TY???9 A TY???0 A TYR 491

Berdasarkan tabel dan 2 dan Gambar1. diperoleh skor doking dari senyawa *Nephrolepis cordifolia* terhadap enzim *Nitric Oxide Synthase*. Energi gibbs terendah diperoleh oleh senyawa  $\beta$ -sitosterol yaitu -9.4270 kcal/mole. Dan ikatan yang terbentuk adalah ikatan Hidrofob. Senyawa fern-9(11)-ene dan  $\beta$ -ionone adalah hidrofob. Oleanolic acid mampu membentuk ikatan hidrogen dengan residu Arg199 dan Met 120. Benzyl butyl phthalate membentuk ikatan hidrogen dengan CYS200 dan TRP372. Ligand native (omega-imidazolyl-decanoic acid) mampu membentuk ikatan hidrogen dengan Arg199 dan TYR 489.

Pembukaan kantong spesifik isozim di iNOS dihasilkan dari perubahan konformasi yang diizinkan dari residu kulit pertama dan kulit kedua yang dilestarikan pada pengikatan inhibitor. Pergerakan kecocokan terinduksi selektif ini bergantung pada perbedaan plastisitas dalam residu yang dilestarikan yang terletak jauh dari kantong pengikat substrat. Memanfaatkan perubahan fleksibilitas untuk meningkatkan potensi inhibitor kemungkinan dapat diterapkan pada sistem enzim kunci lainnya dengan situs aktif yang sangat dilestarikan, termasuk HIV reverse transkriptase, aldose reduktase, siklooksigenase, dan kinase [10]. Dalam NOS, residu cangkang kedua dan cangkang ketiga spesifik isozim mempengaruhi plastisitas residu cangkang pertama yang invarian, dan dengan demikian menentukan selektivitas isozim. Dalam semua keluarga enzim ini, kantong pengikatan baru berbeda dari situs aktif dan dapat diakses setelah perubahan konformasi adaptif dari residu yang dilestarikan [11].

 $\beta$ -sitosterol

fern-9(11)-ene



**Gambar 1. Visualisasi 3 dimensi antara ligand dan Nitric Oxide Synthase**

Isozim NOS prototipe dapat digunakan untuk memahami afinitas pengikatan dan spesifisitas inhibitor enzim. Struktur kami menunjukkan bahwa plastisitas residu diferensial dapat dieksploitasi untuk perubahan konformasi yang menciptakan kantong spesifisitas baru yang sesuai untuk desain inhibitor spesifik isozim [12]. Pengikatan ini memiliki implikasi yang menarik bagi penemuan obat, dan menunjukkan bahwa kristalografi sinar-X sangat penting untuk mengungkap perbedaan halus namun penting dalam plastisitas residu antara isozim yang berkerabat dekat (misalnya iNOS vs. eNOS) atau antara enzim homolog dari organisme berbeda [13]. Peran penting residu cangkang kedua dan ketiga dalam menentukan plastisitas residu cangkang pertama yang dilestarikan akan menambah tantangan yang ada dalam memodelkan protein yang diinduksi secara akurat. Struktural sistematis yang dikombinasikan dengan mutagenesis dapat mengidentifikasi perbedaan rantai samping penentu selektivitas yang jauh dari situs aktif, sehingga mengatasi hambatan yang ditimbulkan oleh konservasi situs aktif untuk desain obat spesifik isozim [14].

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap *Nephrolepis cordifolia* senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor *nitric oxide synthase* adalah Oleanolic acid dan Benzyl butyl phthalate. Berdasarkan kemampuan membentuk ikatan hidrogen dengan enzim *nitric oxide synthase*.

#### Daftar Pustaka

- [1] U. Förstermann and W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: regulation and function.," *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, pp. 829–37, 837a-837d, Apr. 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- [2] W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles, "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.," *Biochem. J.*, vol. 357, no. Pt 3, pp. 593–615, Aug. 2001, doi: 10.1042/0264-6021:3570593.
- [3] F. Shari and G. Ahmed, "The Level of Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide in Hypertensive Women," *J. Pharm. Negat. Results*, vol. 13, pp. 236–239, Oct. 2022.
- [4] P. Verma, "Role of Nitric Oxide Synthase in Platelets of Breast Carcinoma," Jul. 2022.
- [5] S. Mulani *et al.*, "Morphological, Histological and Phytochemical Features of *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl," *Natl. Acad. Sci. Lett.*, Sep. 2023, doi: 10.1007/s40009-023-01348-2.
- [6] P. Potensi, D. Jus, R. Nephrolepis, T. Tikus, A. Rajasekaran, and S. Vellaichamy, "Evaluation of Diuretic Potential of *Nephrolepis cordifolia* Rhizome Juice in Wistar Rats,"

- Sains Malaysiana*, vol. 38, pp. 57–59, Feb. 2009.
- [7] F. J. Mary, D. M. S. Kumar, E. Vijaykumar, G. Yadeshwaran, V. Yamuna, and E. Yuvalakshmi, “Nephrolepis cordifolia: A Review on the fern,” *J. Univ. Shanghai Sci. Technol.*, vol. 23, pp. 301–305, Oct. 2021, doi: 10.51201/JUSST/21/09689.
- [8] G. Ahmed, F. Shry, H. Almashhadani, and M. Kadhim, “The Level of Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide in Hypertensive Women,” *J. Pharm. Negat. Results*, vol. 13, pp. 236–239, Sep. 2022, doi: 10.47750/pnr.2022.13.03.038.
- [9] J. Shamsara *et al.*, “Evaluation of serum nitric oxide synthase levels in patients with coronary slow flow based on corrected TIMI frame count,” *Arch. Med. Sci. - Atheroscler. Dis.*, vol. 8, pp. 140–145, Jan. 2024, doi: 10.5114/amsad/176659.
- [10] X.-X. Xu *et al.*, “Neuronal nitric oxide synthase/reactive oxygen species pathway is involved in apoptosis and pyroptosis in epilepsy,” *Neural Regen. Res.*, vol. 18, p. 1277, Jun. 2023, doi: 10.4103/1673-5374.357906.
- [11] J. Lee *et al.*, “Neuronal nitric oxide synthase is required for erythropoietin stimulated erythropoiesis in mice,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, p. 1144110, Feb. 2023, doi: 10.3389/fcell.2023.1144110.
- [12] H. Li *et al.*, “Crystallographic and Computational Insights into Isoform-Selective Dynamics in Nitric Oxide Synthase,” *Biochemistry*, vol. 63, Feb. 2024, doi: 10.1021/acs.biochem.3c00601.
- [13] A. Alam, S. Smith, S. Gobalakrishnan, M. McGinn, V. Yakovlev, and C. Rabender, “Uncoupled nitric oxide synthase activity promotes colorectal cancer progression,” *Front. Oncol.*, vol. 13, p. 1165326, Mar. 2023, doi: 10.3389/fonc.2023.1165326.
- [14] O. Mishra, R. Mishra, Q. M. Ashraf, and M. Delivoria-Papadopoulos, “Nitric oxide-mediated mechanism of neuronal nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase expression during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets,” *Neuroscience*, vol. 140, pp. 857–863, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.060.