

**SENYAWA FITOESTROGEN UNTUK POTENSI TERAPI PENYAKIT NEURODEGENERATIF  
TERHADAP RESEPTOR TLR2: PENDEKATAN *IN SILICO***

Faisal Akhmal Muslikh, Rizki Rahmadi Pratama, Marisca Evalina Gondokesumo

**Corresponding author:**

Marisca Evalina  
Gondokesumo  
[mariscaevalina@gmail.com](mailto:mariscaevalina@gmail.com)  
Faculty of Pharmacy,  
University of Surabaya

Faisal Akhmal Muslikh  
Department of  
Pharmaceutical Sciences,  
Faculty of Pharmacy,  
Airlangga University

Rizki Rahmadi Pratama  
Department of  
Pharmaceutical Sciences,  
Faculty of Pharmacy,  
Airlangga University

**Abstract.** *Background: Toll-like receptors (TLRs) are generally expressed in the central nervous system (CNS) and play an important role in cell survival, including neurons, microglia, astrocytes, and oligodendrocytes. TLR2 is one of the most studied TLR groups and is associated with neurodegenerative diseases because it can cause pro-inflammatory conditions in the CNS. Phytoestrogen compounds are able to replace the role of estrogen in maintaining body homeostasis, including in the CNS. This study aims to determine the role of phytoestrogen compounds in inhibiting TLR2 (6NIG) activation, which can cause neurodegenerative diseases. Method: The method used is molecular docking with the AutoDockTools 1.5.6 program. Predictions of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties were carried out using SwissADME, while for toxicity using pkCSM and ProTox II. Results and Discussion: The docking results using the 6NIG protein revealed that the compounds  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin had the highest binding potential when compared to the positive control, 17 $\beta$ -estradiol. Pharmacokinetic and pharmacodynamic tests showed that both compounds have good permeability, strong lipophilicity so they can penetrate cell membranes, and are not toxic. Conclusion: the compound has the potential to treat neurodegenerative diseases by targeting the TLR2 (6NIG) receptor.*

**DOI**

**Histori Artikel**

Received :19-04-2023  
Reviewed :09-05-2023  
Accepted :17-05-2023  
Published :26-05-2023

**Kata Kunci**

ADMET; *in silico*;  
neurodegenerativ  
e; phytoestrogen  
compounds;  
TLR2;

**PENDAHULUAN.** Toll-like receptor (TLRs) merupakan growing family yang berperan penting dalam respon imun bawaan seperti monosit/makrofag dan sel dendrit, tetapi juga dapat ditemukan pada sel imun adaptif dan sel non-imun, umumnya terletak di

membran plasma terkecuali untuk TLR3, TLR7 dan TLR9 yang terdapat pada vesikel intraseluler seperti reticulum endoplasma,

endosome atau lisosom (Liu et al., 2014; Fiebich et al., 2018; Kwon et al., 2019). TLRs secara umum diekspresikan dalam sistem saraf pusat (SSP) dan memainkan peran penting dalam keberlangsungan hidup sel baik sel neuron, mikroglia. TLR2 merupakan salah satu kelompok TLRs yang banyak diteliti dan terlibat dalam berbagai proses

peran penting dalam keberlangsungan hidup sel baik sel neuron, mikroglia

persinyalan intraseluler yang dapat menginduksi ekspresi gen inflamasi yang berujung pada penyakit neurodegeneratif (Kwon et al., 2019; Dallas et al., 2021). Senyawa fitoestrogen merupakan senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan, memiliki kemiripan struktur dengan hormone endogen manusia, dalam hal ini adalah 17 $\beta$ -estradiol (Rietjens 2017; Domínguez-López et al., 2020; Ma'arif et al., 2021; Lavier and Pelissero, 2023), sehingga mampu menggantikan peran estrogen dalam menjaga homeostasis tubuh.

Secara struktur senyawa fitoestrogen terbagi dalam dua golongan, yakni golongan flavonoid dan non-flavonoid (Ma'arif et al., 2022), contoh senyawa fitoestrogen dari golongan flavonoid adalah Genistein, Daidzein, Glycitein, Formonoetin, Biochanin A, dan Equol, Quersetin, Kaemferol, sedangkan dari golongan non-flavonoid seperti Pinoresinol, Eudesmin,  $\alpha$ -amyrin dan  $\beta$ -amyrin (Mirza dkk., 2021; Ma'arif et al., 2022). Senyawa fitoestrogen memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan diantaranya seperti menjaga kesehatan reproduksi, jantung, tumor, tulang, kulit, SSP serta dapat menurunkan berat badan (Desmawati and Sulastri., 2019). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui peran senyawa fitoestrogen dalam menghambat aktivasi TLR2 (PDB ID 6NIG) yang dapat menyebabkan penyakit neurodegenerative.

#### **METODE.** Alat dan bahan

Alat yang digunakan berupa laptop Legion 5 Pro 16AC6H dengan spesifikasi 16.0 gigabyte RAM (*Random Access Memory*), AMD Ryzen 7 5800H *Processor*, *Radeon graphics* 3.20 GHz, NVIDIA GeForce RTX 3060 *Graphic Card*, Microsoft® Windows® 10 *Pro operating system*. *Software* yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya Avogadro untuk meminimisasi energi dan *Swiss PDB viewer* yang digunakan untuk optimasi protein. Autodock 4.2.6 yang digunakan untuk *molecular docking*, *Discovery studio visualizer* dan PyMOL digunakan untuk visualisasi interaksi antara protein-ligan. SwissADME digunakan untuk memprediksi sifat farmakokinetik dan farmakodinamik, sedangkan pKCSM dan ProTox II digunakan untuk memprediksi sifat toksik senyawa yang diuji.

#### **Molecular docking**

*Molecular docking* senyawa fitoestrogen terhadap reseptor TLR2 dengan protein ID PDB 6NIG dilakukan menggunakan perangkat lunak Autodock 4.2.6. Langkah pertama yang dilakukannya adalah mengunggah protein dan ligan

menggunakan autodock, deteksi, dan penentuan torsi untuk muatan parsial *Gasteiger* dan *Kollman* secara otomatis ditambahkan ke senyawa uji. Kemudian pada pengaturan *grid box* digunakan dari hasil validasi metode dimana ukuran *grid box* yang digunakan adalah 50 x 40 x 60 dengan koordinat (X= 5,109, Y= 13.253, Z= 102.569) dan jarak *grid points* yang digunakan adalah 0,375 Å. *Setting running docking* menggunakan *Lamarckian Genetic Algorithm* dengan ukuran populasi 150 dan jumlah maksimal evaluasi adalah 2.500.000 untuk setiap 100 kali konformasi.

Evaluasi hasil docking adalah konformasi terbaik yang ditandai dengan skor *energy binding* ( $\Delta G$ ) dengan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) terendah serta interaksi asam amino esensial fungsional yang terdeteksi berperan dalam interaksi *docking* oleh *Discovery Studio Visualizer*. Prediksi ADMET

Format masing-masing senyawa diubah dalam bentuk *simplified molecular-input line-entry system* (SMILES) menggunakan ChemDraw Ultra 12.0. Bentuk SMILES digunakan agar senyawa dapat dianalisis sifat farmakokinetik dan farmakodinamik agar sebanding dengan senyawa dalam tata nama IUPAC (Sliwoski, 2014; Muslikh et al., 2023). Format tersebut kemudian disalin satu persatu pada *webtool* SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) dan diklik run untuk mengetahui sifat farmakokinetik dan farmakodinamik tiap senyawa, hasil yang dapat diambil berupa berat molekul, nilai *topological polar surface area* (TPSA), *hydrogen bond donor* (HBD), *hydrogen bond acceptor* (HBA), log P, dan pernyataan "Yes" atau "No" dalam memenuhi parameter hukum lima Lipinski (Muslikh et al., 2022).

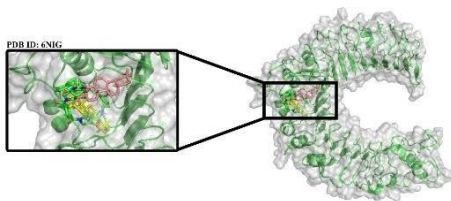
Analisis toksisitas dilakukan dengan memasukkan format SMILES untuk memprediksi nilai LD<sub>50</sub> berdasarkan *globally harmonized system* (GHS) menggunakan ProTox II online tool ([http://tox.charite.de/protox\\_ii/](http://tox.charite.de/protox_ii/)). Format SMILES ditulis pada *Canonical Smiles*, kemudian klik Start Tox-Prediction (Muslikh et al., 2023).

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

*Molecular docking* merupakan metode yang berbasis *in silico* yang telah banyak digunakan dalam penemuan obat (Pinzi and Rastelli, 2019). Docking memungkinkan indentifikasi senyawa baru yang mempunyai efek terapeutik, memprediksi interaksi ligan-targer di tingkat molekuler, serta dapat menggambarkan hubungan struktur aktivitas (HSA). Pendekatan secara *in silico* ini merupakan metode prediksi reaksi antara protein (enzim) dengan ligan, konfirmasi desain obat secara komputasi, juga memiliki beberapa kelebihan diantaranya aplikasinya lebih murah, mengurangi waktu dan tenaga serta dapat meminimalkan isolasi senyawa tidak aktif (Shah et al., 2019; Utami et al., 2020; Shaikh et al., 2022), selain itu pada penelitian yang dilakukan (Pinto et al., 2019; Muslikh et al., 2022), menunjukkan bahwa

aktivitas estrogenik suatu senyawa dapat ditentukan dengan cepat menggunakan pendekatan *in silico*.

Validasi metode dengan menambatkan reseptor dan *ligand native* dilakukan menggunakan Autodock 4.2.6, dari hasil validasi metode pada penelitian didapatkan nilai RMSD 3,217 Å. Nilai ini tidak begitu mempengaruhi hasil penelitian, terbukti dalam hasil nilai *energy binding* dan konstanta inhibisi dari *molecular docking* yang ditunjukkan pada tabel 1. Nilai RMSD ini tidak bisa dioptimalkan kembali karena *grid box* yang digunakan sudah menyesuaikan besarnya *ligand*, jika *grid box* dinaikkan ukurannya maka dapat dimungkinkan nilai RMSD akan meningkat, hal ini dikarenakan area pergerakan dari *ligand* akan lebih besar.



Hasil penambatan *molekular docking* yang baik dapat dilihat dari nilai *energy binding* atau energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ). Nilai *energy binding* menunjukkan kekuatan interaksi biomolekuler dari ikatan antara ligan-reseptor (Odoemelum *et al.*, 2022), semakin rendah nilai *energy binding* menunjukkan semakin stabil interaksi ligan-reseptor sehingga afinitas ligan terhadap reseptor semakin kuat (Lukitasari dkk., 2015). Luaran lain dari *molecular docking* selain *energy binding* score adalah pose, dimana hasil ini dapat menentukan interaksi ligan dengan protein (Lukitasari dkk., 2015; Sawitri dan Prasetyawan, 2019).

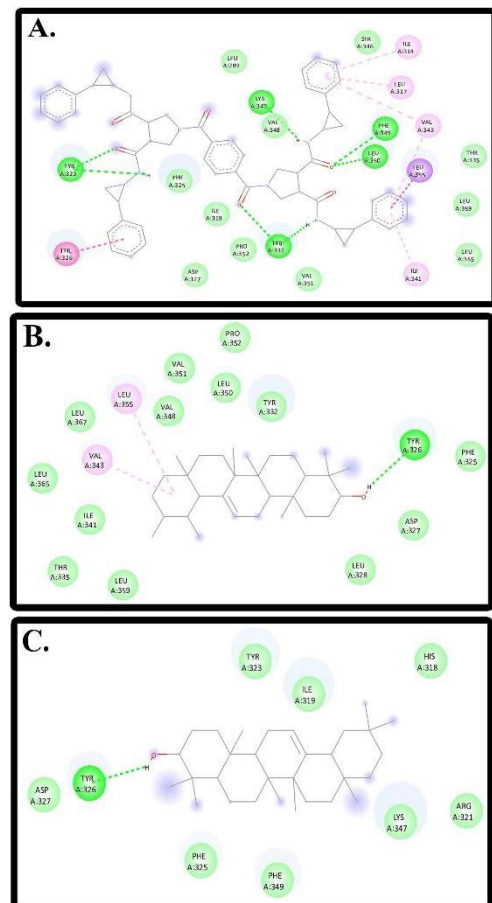
Hasil dari *energy binding* pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel dibawah, yang menunjukkan bahwa *ligand native* memiliki nilai terkecil, kemudian disusul oleh senyawa  $\alpha$ -Amyrin,  $\beta$ -Amyrin, dan  $17\beta$ -estradiol yang merupakan senyawa pembanding, secara berurutan. Hal ini menunjukkan bahwa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan  $17\beta$ -estradiol dalam memberikan interaksi terhadap reseptor TLR2 dengan PDB ID 6NIG.

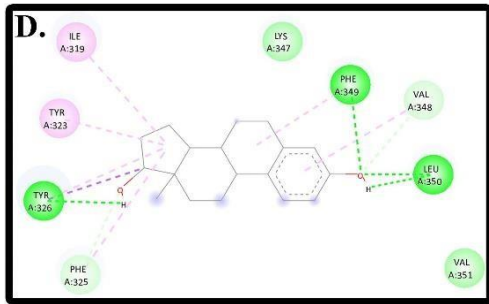
Nilai  $K_i$  menandakan konsentrasi yang diperlukan untuk dapat memberikan setengah dari nilai penghambatan maksimum, nilai  $K_i$  yang kecil dapat mengakibatkan afinitas ligan terhadap makromolekul semakin kuat (Mardianingrum *et al.*, 2015; Az-zahra dkk., 2022). Pada tabel 1, dapat dilihat bahwa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin memiliki afinitas yang

kuat terhadap reseptor TLR2 dengan PDB ID 6NIG, dibandingkan  $17\beta$ -estradiol, dikarenakan nilainya lebih kecil dari pada senyawa pembanding  $17\beta$ -estradiol.

**Tabel 1.** Nilai *energy binding* dan konstanta inhibisi dari *molecular docking* terhadap 6NIG

Senyawa	Energy binding(Kcal/mo l)	Konstanta inhibisi
Ligand Native	-10,9	10.19 nM
$\alpha$ -Amyrin	-9,51	107.31 nM
$\beta$ -Amyrin	-9,30	152.69 nM
$17\beta$ -Estradiol	-8,66	446.91 nM
Quercetin	-7,79	1.96 $\mu$ M
Eudesmin	-7,60	2.67 $\mu$ M
Kaemferol	-7,55	2.91 $\mu$ M
Glycitin	-6,89	8.95 $\mu$ M
Daidzein	-6,86	9.44 $\mu$ M
Equol	-6,85	9.49 $\mu$ M
Genistein	-6,59	14.89 $\mu$ M
Pinosterol	-6,43	19.28 $\mu$ M
Formoneti n	-6,42	19.77 $\mu$ M
Biochanin A	-6,31	23.68 $\mu$ M





**Gambar 2.** Visualisasi Hasil Docking 2D, (A) *ligand native*, (B)  $\alpha$ -Amyrin, (C)  $\beta$ -Amyrin, (D) 17 $\beta$ -Estradiol.

Pengamatan dari residu asam amino dari intetaksi senyawa uji dengan protein target ini bertujuan untuk melakukan identifikasi interaksi yang terjadi dan yang diduga berinteraksi dalam munculnya efek farmakologi inhibitor TLR2 oleh senyawa uji Interaksi ikatan tersebut berupa ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi Van der Waals, interaksi elektrostatis dan halogen. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang terkuat di antara ikatan non-kovalen lainnya namun ikatan hidrogen lebih lemah dibandingkan ikatan ion atau ikatan kovalen oleh karena itu ikatan hidrogen paling banyak tersebar dalam menghasilkan aktivitas farmakologi (Rahmadi, 2021).

Residu asam amino merupakan asam amino suatu protein yang mengikat suatu ligan atau senyawa, dengan sisi aktif pengikatan protein berbeda tiap asam amino, persentase kesamaan residu asam amino antara senyawa dengan kontrol (*ligand native*) menunjukkan potensi kesamaan sisi aktif, yang akan memberikan ikatan kuat dan aktivitas biologis yang sama seperti kontrol (Rochim dkk., 2021; Hidayatullah dkk., 2022).

**Tabel 2.** Kesamaan Residu Asam Amino terhadap *Ligand native*

Senyawa	Residu Asam Amino	Jumlah Ikatan Residu Asam Amino dibandingkan <i>Ligand native</i>	Persentase Ke Residu Asam terhadap <i>Li native</i>
<i>Ligand native</i>	Van der wals: LEU 289, SER 346, VAL 348, THR 335, LEU 359, LEU 365, VAL 351, PRO 352, ASP 327, ILE 319, PHE 325 Conventional hydrogen bond: TYR 323, LYS 347, TYR 332, PHE 349, LEU 350 Pi-sigma: LEU 355 Pi-Pi Stacked: TYE 326 Pi-Alkyl: ILE 314, LEU 317, VAL 343, ILE 341	22	100%
$\alpha$ -Amyrin	Van der wals: LEU 359, THR 335, ILE 341, LEU 365, LEU 367, VAL 348, VAL 351, PRO 352, TYR 332, PHE 325, ASP 327, LEU 328 Conventional hydrogen bond: TYR 326, LEU 350 Alkyl: LEU 355, VAL 343	16	59,09%
$\beta$ -Amyrin	Van der wals: ASP 327, PHE 325, PHE 349, LYS 347, ARG 321, HIS 318, ILE 319, TYR 323 Conventional Hydrogen Bond: TYR 326	9	27,27%
17 $\beta$ -estradiol	Van der wals: VAL 351 Conventional hydrogen bond: TYR 326, PHE 349, LEU 350 Carbon hydrogen bond: PHE 325, VAL 348 Pi-sigma: TYR 326 Alkyl: ILE 319, TYR 323, TYR 326, PHE 325	11	36,36%

Sifat farmakokinetik dan farmakodinamik senyawa diprediksi menggunakan *webtool* SwissADME dan dapat diketahui bahwa senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin merupakan senyawa terbaik dalam hasil *molecular docking* juga dapat diterima oleh tubuh (Tabel 3) (Ma'arif *et al.*, 2021), sifat ini dilihat dari parameter hukum lima Lipinski. Parameter hukum Lima Lipinski yang diamati diantaranya adalah nilai HBD <5, HBA <10, log P <5 dan berat molekul <500 g/mol. Senyawa dengan berat molekul dibawah 500 g/mol mengartikan menandakan senyawa uji dapat melewati membran biologis. Nilai H-aseptor dan H-donor mengartikan jumlah ikatan hidrogen, semakin besar nilainya maka semakin tinggi energi yang diperlukan untuk proses absorpsi. Nilai log P menunjukkan kemampuan senyawa uji dapat larut dalam cairan membran, yang menunjukkan sifat kepolaran suatu senyawa (Lipinski *et al.*, 1997). Senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin memiliki nilai TPSA < 79 Å<sup>2</sup>, yang menunjukkan bahwa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin mampu menembus sawar darah otak dan memberikan efek (Villa *et al.*, 2016; Ma'arif *et al.*, 2022).

**Tabel 3.** Analisis sifat farmakokinetik dan farmakodinamik senyawa uji

Nama Senyawa	BM $\leq$ 500 g/mol	Log P $\leq$ 5	HBA $\leq$ 10	HBD $\leq$ 5	Lipinski's Rule of Five	TPSA (Å <sup>2</sup> )
Senyawa pembanding						
17 $\beta$ -estradiol	272.38	3.40	2	2	Yes	40.46
Senyawa uji fitoestrogen						
$\alpha$ -Amyrin	426.72	7.06	1	1	Yes	20.23
$\beta$ -Amyrin	426.72	7.20	1	1	Yes	20.23

Uji toksisitas senyawa uji dilakukan menggunakan online *webtools* ProTox II. Penggolongan toksisitas diklasifikasikan berdasarkan *globally harmonized system* (GHS) menjadi 6 kelas toksisitas LD<sub>50</sub>, kelas I (LD<sub>50</sub> ≤ 5 mg/kg) mematikan jika tertelan, kelas II (5 < LD<sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg) mematikan jika tertelan, kelas III (50 < LD<sub>50</sub> ≤ 300 mg/kg) beracun jika dimakan, kelas IV (300 < LD<sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg) berbahaya jika tertelan, kelas V (2000 < LD<sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg) berbahaya jika tertelan, dan kelas VI (LD<sub>50</sub> > 5000 mg/kg). tidak beracun (Ma'arif *et al.*, 2021). Semakin tinggi nilai LD<sub>50</sub>, maka semakin aman zat tersebut bagi tubuh/tidak toksik, begitu pula sebaliknya (Supandi *et al.*, 2018). Hasil penelitian menunjukkan bahwa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin tidak bersifat toksik yang berada di kelas VI.

**Tabel 4.** Analisis sifat toksisitas senyawa uji

Nama Senyawa	Hepatotoxicity*	Skin Sensitization*	Ames Toxicity*	Kelas Toksisitas LD <sub>50</sub> **
Senyawa pembanding				
17 $\beta$ -estradiol	No	No	No	IV
Senyawa uji fitoestrogen				
$\alpha$ -Amyrin	No	No	No	VI
$\beta$ -Amyrin	No	No	No	VI

memprediksi nilai hepatotoksitas, sensitisasi kulit, dan toksisitas Ames, sedangkan alat online ProTox II digunakan untuk memperkirakan kelas toksisitas senyawa LD<sub>50</sub>. Salah satu jenis toksisitas yang digunakan untuk menemukan zat yang berbahaya bagi hati adalah hepatotoksitas (Ma'arif *et al.*, 2021; Cheng, 2009). Sensitisasi kulit merupakan reaksi hipersensitivitas yang dipicu oleh zat reaktif yang menembus lapisan stratum korneum kulit (Ma'arif *et al.*, 2021; Verheyen *et al.*, 2017). Toksisitas ames merupakan salah satu pendekatan yang digunakan untuk menentukan aktivitas mutagenik dan karsinogenik dari berbagai bahan kimia (Ma'arif *et al.*, 2021; Verheyen *et al.*, 2012).

Tabel 4 menunjukkan bahwa senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin merupakan senyawa yang tidak beracun untuk hepatotoksitas, sensitisasi kulit, dan toksisitas Ames. Temuan uji toksisitas menunjukkan bahwa senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin tidak bersifat toksik.

Pemberian senyawa bahan alam (*Natural products medicine*) yang memiliki banyak komponen senyawa (*multicompounds*) ini bermanfaat dalam mencegah dan mengobati berbagai penyakit (Rao *et al.*, 2021; Rizvi *et al.*, 2022; Vaou *et al.*, 2022). Secara keseluruhan aktivitas dari ekstrak tanaman obat adalah hasil dari aksi gabungan beberapa senyawa dengan aktivitas sinergis, aditif, atau antagonis (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009; Ulrich-Merzenich, 2010; Junio *et al.*, 2011). Pada penelitian ini, kami menyoroti peran senyawa fitoestrogen dalam menghambat aktivasi TLR2 yang dapat menyebabkan penyakit *neurodegenerative*.

TLRs diaktifkan oleh *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), dan *damage associated molecular patterns* (DAMPs) untuk merespon imun bawaan dan adaptif (Gorecki *et al.*, 2021). Jalur persinyalan TLRs ini di mediasi oleh interaksi protein seperti *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88) dan *Toll/interleukin 1 receptor* (TIR) *domain-containing adaptor interferon- $\beta$*  (TRIF) (Xing and Zhou, 2017; Fiebich *et al.*, 2018). Aktivasi TLRs mengarah pada respon transkripsional yang beragam, yang berujung pada pengaktifan faktor transkripsi *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) pada nukleus, yang menghasilkan produk mediator sitokin proinflamasi dan siklooksigenase-2 (Fiebich *et al.*, 2018; Aluri *et al.*, 2021).

Peningkatan ekspresi TLR2 ini berujung pada aktivasi NF- $\kappa$ B, sehingga akan mempengaruhi proses transkripsi DNA (Ma'arif *et al.*, 2022). Kondisi ini akan mengakibatkan sel mikroglia akan teraktivasi pada keadaan M<sub>1</sub> *polarity* yang juga

menghasilkan sitokin proinflamasi seperti MHCII (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2017;

Ma'arif *et al.*, 2021). Penghambatan aktivasi TLRs dengan adanya senyawa fitoestrogen ini akan menghambat aktivitas mikroglia dari M<sub>1</sub> *polarity* menjadi M<sub>2</sub> *polarity*, sehingga akan memproduksi sitokin antiinflamasi seperti Arg1 (Cui *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2021). Selain itu, penekanan aktivasi TLR2 akan mengurangi agregasi dari  $\alpha$ -synuclein yang berujung pada pengurangan aktivasi sel glia dalam menyebabkan inflamasi (Kwon *et al.*, 2019).

Mekanisme tersebut mendukung bahwa senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin mampu mengikat TLR2 dengan PDB ID 6NIG, sehingga aktivasi TLR2 dapat dihambat. Penghambatan jalur TLR2 dapat membentuk dasar intervensi terapeutik baru dalam mengatasi neurodegeneratif melalui penurunan sitokin inflamasi (Dzamko *et al.*, 2017). Oleh karena itu, senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antineuroinflamasi.

**KESIMPULAN** Senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin merupakan senyawa fitoestrogen yang memberikan hasil terbaik dalam molecular docking dari nilai energi binding dan konstanta inhibisi dibandingkan senyawa pembading 17 $\beta$ -estradiol, dan memberikan hasil yang baik dari sifat farmakokinetik dan farmakodinamik, serta tidak bersifat toksik. Sehingga senyawa  $\alpha$ -Amyrin dan  $\beta$ -Amyrin memiliki potensi untuk terapi penyakit neurodegeneratif terhadap reseptor TLR2 (6NIG).

#### DAFTAR RUJUKAN

- Aluri, J., Cooper, M. A., & Schuettpelez, L. G. (2021). Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system. *Cells*, 10(6), 1374.
- Az-Zahra, F., Afidika, J., Diamantha, S. D., Rahmani, A. E., Fatimah, S., Aulifa, D. L., & Sitinjak, B. D. (2022). Studi In Silico Senyawa dalam Daun Sirih (Piper betle L.) sebagai Inhibitor Enzim Asetilkolinesterase (AChE) pada Penyakit Alzheimer. *Indonesian Journal of Biological Pharmacy*, 2(2), 44-58.
- Lavier, M. C. C., & Pelissero, C. B. (2023). Phytoestrogens and Health Effects. *Nutrients*, 15(2), 317.
- Cheng, A. (2009). In silico prediction of hepatotoxicity. *Current Computer-Aided Drug Design*, 5(2), 122-127.
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 19(3), 197-209.
- Dallas, M. L., & Widera, D. (2021). TLR2 and TLR4-mediated inflammation in Alzheimer's disease: self-defense or sabotage?. *Neural Regeneration Research*, 16(8), 1552.
- Desmawati, D., & Sulastri, D. (2019). Phytoestrogens and their health effect.

- Open access Macedonian journal of medical sciences*, 7(3), 495.
- Domínguez-López, I., Yago-Aragón, M., Salas-Huetos, A., Tresserra-Rimbau, A., & Hurtado-Barroso, S. (2020). Effects of dietary phytoestrogens on hormones throughout a human lifespan: A review. *Nutrients*, 12(8), 2456.
- Dzamko, N., Gysbers, A., Perera, G., Bahar, A., Shankar, A., Gao, J., ... & Halliday, G. M. (2017). Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta neuropathologica*, 133, 303-319.
- Engler-Chiurazzi, E. B., Brown, C. M., Povroznik, J. M., & Simpkins, J. W. (2017). Estrogens as neuroprotectants: estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Progress in neurobiology*, 157, 188-211.
- Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., & De Oliveira, A. C. P. (2018). Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 329.
- Gorecki, A. M., Anyaegbu, C. C., & Anderton, R. S. (2021). TLR2 and TLR4 in Parkinson's disease pathogenesis: the environment takes a toll on the gut. *Translational Neurodegeneration*, 10(1), 1-19.
- Hidayatullah, J.A., Widiyana, A.P., & Damayanti, D.S. (2022). Studi In Silico: Analisis Potensi Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*) Sebagai Anti-Alzheimer dengan Aktivasi Alfa Sekretase dan Penghambatan Beta Sekretase. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*, 9(1).
- Junio, H.A., Sy-Cordero, A.A., Ettefagh, K.A., Burns, J.T., Micko, K.T., Graf, T.N., ..., Cech, N.B. (2011). Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Journal of natural products*, 74(7), 1621-1629.
- Kwon, S., Iba, M., Masliah, E., & Kim, C. (2019). Targeting microglial and neuronal toll-like receptor 2 in synucleinopathies. *Experimental Neurobiology*, 28(5), 547.
- Kwon, H. K., Patra, M. C., Shin, H. J., Gui, X., Acheh, A., Panneerselvam, S., ... & Choi, S. (2019). A cell-penetrating peptide blocks Toll-like receptor-mediated downstream signaling and ameliorates autoimmune and inflammatory diseases in mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(4), 1-19.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- Liu, Y., Yin, H., Zhao, M., & Lu, Q. (2014). TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 47, 136-147.
- Lukitaningsih, E., Wisnusaputra, A., & Sudarmanto, B. A. (2009). Scring in silico active compound of *Pachyrrhizus erosus* as antitirozinase on *Aspergillus oryzae* (computational study with homology modeling and molecular docking). *Majalah Obat Tradisional*, 20(1), 7-15.
- Ma'arif, B., Muslikh, F. A., Najib, L. A., Atmaja, R. R. D., & Dianti, M. R. (2021, December). In silico antiosteoporosis activity of 96% ethanol extract of *Chrysophyllum cainito* L. leaves. In *Proceedings of International Pharmacy Ulul Albab Conference and Seminar (PLANAR)* (Vol. 1, pp. 61-66).
- Ma'arif, B., Muslikh, F. A., Fihuda, D. A. P., Syarifuddin, S., & Fauziyah, B. (2021, December). Prediction of compounds from 96% Ethanol Extract of *Marsilea crenata* Presl. Leaves in increasing estrogen receptor- $\alpha$  activation. In *Proceedings of International Pharmacy Ulul Albab Conference and Seminar (PLANAR)* (Vol. 1, pp. 67-76).
- Ma'arif, B., Muslikh, F. A., Anggraini, W., Taek, M. M., Laswati, H., & Agil, M. (2021). In vitro anti-neuroinflammatory effect of genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) on microglia HMC3 cell line, and in silico evaluation of its interaction with estrogen receptor- $\beta$ . *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 13(4), 183-192.
- Ma'arif, B., Aminullah, M., Saidah, N. L., Muslikh, F. A., Rahmawati, A., Indrawijaya, Y. Y. A., ... & Taek, M. M. (2021). Prediction of antiosteoporosis activity of thirty-nine phytoestrogen compounds in estrogen receptor-dependent manner through in silico approach. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 5(10), 1727-1734.
- Ma'arif, B., Fihuda, D. A. P., Muslikh, F. A., Syarifuddin, S., Fauziyah, B., Sari, D. P., & Agil, M. (2022). Studi in silico penghambatan aktivasi TLR2 ekstrak etanol daun semanggi (*Marsilea crenata* Presl.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, 15(1), 31-40.
- Ma'arif, B., Suryanto, S., Muslikh, F. A., Suryadinata, A., & Fauziyah, B. (2022). Systematic Review: Anti-Osteoporosis Potential Activities Of Phytoestrogen Compounds In *Chrysophyllum cainito* L., *Elaeis guineensis* Jacq., *Lannea acida* Rich., *Marsilea crenata* Presl., and *Medicago sativa* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*, 19(1), 41-52.
- Ma'arif, B., Samudra, R. R., Muslikh, F. A., Dewi, T. J. D., & Muchlasi, L. A. (2022, December).

- Antineuroinflammatory Properties of Compounds from Ethyl Acetate Fraction of *Marsilea crenata* C. Presl. Against Toll-Like Receptor 2 (3A7B) In Silico. In *Proceedings of International Pharmacy Ulul Albab Conference and Seminar (PLANAR)* (Vol. 2, pp. 8-20).
- Ma'arif, B., Muslikh, F. A., Amalia, D., Mahardiani, A., Muchlasi, L. A., Riwanti, P., ... & Agil, M. (2022). Metabolite Profiling of the Environmental-Controlled Growth of *Marsilea crenata* Presl. and Its In Vitro and In Silico Antineuroinflammatory Properties. *Borneo Journal of Pharmacy*, 5(3), 209-228.
- Mardianingrum, R., Herlina, T., & Supratman, U. (2015). Isolasi dan Molecular Docking Senyawa 6, 7-Dihidro-17-Hidroksierisotrin dari Daun Dadap Belendung (*Erythrina poeppigiana*) terhadap Aktivitas Sitotoksik Antikanker Payudara MCF-7. *Chimica et Natura Acta*, 3(3).
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135-145.
- Merdekawati, F. (2018). In silico study of pyrazolylaminoquinazoline toxicity by lazar, protox, and admet predictor. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(9), 119-129.
- Mirza, D. M., Ma'arif, B., Purbosari, I., Hardjono, S., & Agil, M. (2021). Prediksi Aktivitas Fitoestrogenik Senyawa Golongan Flavonoid terhadap Receptor Estrogen- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) dengan pendekatan In Silico. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(4), 512-519.
- Muslikh, F. A., Samudra, R. R., Ma'arif, B., Ulhaq, Z. S., Hardjono, S., & Agil, M. (2022). In Silico Molecular Docking and ADMET Analysis for Drug Development of Phytoestrogens Compound with Its Evaluation of Neurodegenerative Diseases. *Borneo Journal of Pharmacy*, 5(4), 357-366.
- Muslikh, F. A., Samudra, R. R., & Ma'arif, B. (2023). Prediksi Senyawa Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) Sebagai Agen Antineuroinflamasi (agonis ER $\alpha$ ). *JIKSN: Jurnal Ilmu Kesehatan dan Sains Nusantara*, 1(01), 10-21.
- Nashihah, S. (2021). Studi Penambatan Molekuler Senyawa Flavonoid Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Terhadap Sars-Cov-2 3cl Protease: Molecular Docking Study of Flavonoid Compounds The Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) Against Sars-Cov-2 3CL Protease. *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 6(1), 9-24.
- Odoemelam, C. S., Hunter, E., Simms, J., Ahmad, Z., Chang, M. W., Percival, B., ... & Wilson, P. B. (2022). In silico ligand docking approaches to characterise the binding of known allosteric modulators to the glucagon-like peptide 1 receptor and prediction of ADME/Tox properties. *Applied Biosciences*, 1(2), 143-162.
- Pinto, C. L., Bloom, R. A., & Laurenson, J. P. (2019). An Approach for Using In Vitro and In Silico Data to Identify Pharmaceuticals with Potential (Anti-) Estrogenic Activity in Aquatic Vertebrates at Environmentally Relevant Concentrations. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(10), 2154-2168.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4331.
- Rao, M.T., Yamini, M., Cherukuri, V.S.P., Yarraguntla, S.R. (2021). Alternative Medicine: New Ways to Treat Diseases and Therapies. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(1), 1-12.
- Rietjens, I. M., Lousse, J., & Beekmann, K. (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British journal of pharmacology*, 174(11), 1263-1280.
- Rizvi, S.A., Einstein, G.P., Tulp, O.L., Sainvil, F., Branly, R. (2022). Introduction to Traditional Medicine and Their Role in Prevention and Treatment of Emerging and Re-Emerging Diseases. *Biomolecules*, 12(10), 1442.
- Rochim, N.A., Hakim, R., Damayanti, D.S. (2021). Potensi Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Sebagai Pengaktif LDL Receptor Dan Penghambat HMG-CoA Reductase Secara In silico. *J Kedokteran Komunitas*, 9,11.
- Sawitri, M. E., & Prasetyawan, S. (2019). Studi Interaksi Kompleks Inulin dan Fraksi Kasein Melalui Analisis In-Silico dan Molecular Docking Sebagai Dasar Pengembangan Prebiotic Fermented Milk. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak (JITEK)*, 14(1), 11-19.
- Shah, K., Mujwar, S., Gupta, J. K., Shrivastava, S. K., & Mishra, P. (2019). Molecular docking and in silico cogitation validate mefenamic acid prodrugs as human cyclooxygenase-2 inhibitor. *Assay and drug development technologies*, 17(6), 285-291.
- Shaikh, I. A., Muddapur, U. M., Badiger, S., Kulkarni, M., Mahnashi, M. H., Alshamrani, S. A., ... & Iqbal, S. S. (2022). In silico molecular docking and simulation studies of protein HBx involved in the pathogenesis of hepatitis B virus-HBV. *Molecules*, 27(5), 1513.
- Ulrich-Merzenich, G., Panek, D., Zeitler, H., Vetter, H., Wagner, H. (2010). Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian J. Exp. Biol*, 48, 208-219.



- Utami, W., Aziz, H. A., Fitriani, I. N., Zikri, A. T., Mayasri, A., & Nasrudin, D. (2020, June). In silico anti-inflammatory activity evaluation of some bioactive compound from ficus religiosa through molecular docking approach. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1563, No. 1, p. 012024). IOP Publishing.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. (2022). Interactions between medical plant-derived bioactive compounds: Focus on antimicrobial combination effects. *Antibiotics*, 11(8), 1014.
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., & Maggi, A. (2016). Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Endocrine reviews*, 37(4), 372-402.
- Verheyen, G. R., Braeken, E., Van Deun, K., & Van Miert, S. (2017). Evaluation of in silico tools to predict the skin sensitization potential of chemicals. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 28(1), 59-73.
- Wagner, H., and Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97-110.
- Xing S and Zhou P. (2017). Focalize the Structure of Myd88 in TLR Signaling Pathway to Modulate Innate Immune Response: New Target for Old Diseases. *American Journal of Immunology*, 13(3), 155-157.