

ANALISIS *IN SILICO* PENCEGAHAN PENUAAN KULIT MELALUI PENGHAMBATAN *CELLULAR* *SENESCENCE* TERTARGET INHIBISI CD36 OLEH SENYAWA AKTIF *CINNAMOMUM ZEYLANICUM*

Putri Anggraini Budianto¹, Novia Permata Hapsari¹, Dhiya Ulhaq Salsabila¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

^aEmail Korespondensi : putrianggraini@mail.ugm.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*) merupakan penyebab penuaan kulit dengan mekanisme penuaan sel. CD36 (*Cluster Difference 36*) mengalami overekspresi pada sel yang menua dan menerima aktivator penyebab produksi ROS dan SASP. Kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) mempunyai berbagai aktivitas farmakologis seperti antioksidan. Namun, aktivitas anti penuaan sel oleh kayu manis pada CD36 belum diketahui. Penelitian ini ingin menunjukkan senyawa kayu manis efektif dalam menghambat CD36 dan mengurangi penuaan kulit berlebih lewat penghambatan penuaan sel.

Metode: Studi literatur dan pendekatan *in silico* seperti pencarian database, *molecular docking*, dan aplikasi analisis KNIME digunakan dalam penelitian ini.

Hasil: *Cinnamaldehyde* terbukti menjadi inhibitor kompetitif CD36 yang lebih baik dari ligan asli dan inhibitor yang sudah ada (RMSD: 0,74 Å; S: -7,43 kcal/mol, skor DICE: 0,886; Skor Tanimoto: 0,939). Studi bioinformatika juga menunjukkan bahwa senyawa dominan pada kayu manis menarget regulator CD36, oksidoreduktase, dan reseptor produsen SASP yang koekspresi dengan CD36.

Kesimpulan: Senyawa pada kayu manis diprediksi dapat mencegah penuaan kulit dengan menghambat dan meregulasi CD36, serta meminimalisir faktor penyebab penuaan.

Kata kunci: *Cellular senescence*, penuaan kulit, *in silico*, CD36, *Cinnamomum zeylanicum*.

ABSTRACT

Introduction: Increased ROS (*reactive oxygen species*) and SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) lead to skin aging via cellular senescence. CD36 (*Cluster Difference*

36) is found overexpressed in senescent cells and accepts various activators that generate ROS and SASP. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) has been known to exert several pharmacological effects like antioxidant and anti-senescence. However, its anti-senescence effect on CD36 has not been reported yet. This study aims to prove that cinnamon's compounds are effective to inhibit CD36 in order to stop skin aging caused by senescence.

Methods: Literature studies and *in silico* approaches such as database searching, molecular docking, and KNIME open analytic platform were used in this study.

Result: *Cinnamaldehyde* is proven as a better competitive CD36 inhibitor (DICE Score: 0,886; Tanimoto Score: 0,939) with better affinity than native ligand and previously studied inhibitors (RMSD: 0,74 Å; S: -7,43 kcal/mol). Bioinformatics investigations also showed that major compounds of cinnamon target CD36 regulator, oxidoreductases, and SASP-producing receptors that co-expressed with CD36.

Conclusion: Active components of cinnamon are potential to be an anti skin aging by inhibiting CD36, regulating CD36, and eradicating senescent factors.



Keywords: *Cellular senescence, skin aging, in silico, CD36, Cinnamomum zeylanicum.*

PENDAHULUAN

Cellular senescence atau penuaan pada sel adalah tahapan pada siklus sel yang mana sel tidak bisa bertumbuh dan menjalankan fungsinya [1]. Akumulasi berlebihan dari sel yang mengalami penuaan menyebabkan penuaan dini, terutama pada kulit [2,3,4]. Adapun penyebab utama penuaan sel adalah produksi spesies oksigen reaktif (ROS) berlebih akibat polusi paparan sinar UV, akumulasi lipid berlebih, dan akumulasi SASP (*Senescence Associated-Secretory Phenotype*) [5,6].

Satu-satunya obat pencegah penuaan sel secara umum yang terdaftar di *Food and Drug Administration* (FDA) adalah Rapamycin [7]. Rapamycin menghambat kompleks protein mTOR mengurangi penuaan dengan mengontrol metabolisme mitokondria dan translasi protein pendukung penuaan sel [8]. Namun, penghambatan mTOR dalam jangka panjang menimbulkan resistensi insulin [9]. Selain itu, umumnya digunakan retinol untuk mencegah penuaan kulit secara lokal, tetapi retinol rentan menyebabkan iritasi pada kulit [10]. Dengan demikian, pengembangan obat dan target baru untuk antipenuaan pada kulit dengan mekanisme pencegahan *cellular senescence* masih dibutuhkan.

Cluster Difference 36 (CD36) adalah protein reseptor membran sel yang dapat menerima berbagai aktivator. Jika

aktivator terikat pada CD36, maka terjadi produksi ROS berlebihan dan umpan balik positif berupa overekspresi CD36 [11,12]. Overekspresi CD36 akan meningkatkan ekspresi SASP yang terlibat dalam produksi ROS dan kembali memicu overekspresi CD36 [13]. Oleh karena itu, diperlukan penghambat (inhibitor) CD36 dengan aktivitas antioksidan sehingga jumlah ROS yang sudah ada dapat ditekan dan tidak terjadi inisiasi SASP yang menyebabkan *cellular senescence* berlebihan tidak terjadi.

Kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum* Linn.) mengandung senyawa kimia yang mempunyai efek antioksidan dan anti-*senescence* pada *stem cell* [14,15]. Maka dapat dikatakan kayu manis memiliki peluang untuk menjadi agen antipenuaan sel yang memiliki aktivitas antioksidan. Namun, sejauh ini belum ada penelitian yang menyorot tentang aktivitas senyawa aktif kayu manis pada protein CD36 untuk menghambat penuaan sel, terkhusus pada penuaan sel kulit.

Pengujian *in silico* (pendekatan komputasi) diperlukan untuk menyeleksi senyawa aktif kayu manis mana yang paling baik untuk menghambat CD36 dan membandingkan aktivitasnya dengan inhibitor yang sudah ada. Dari hasil analisis *in silico*, diharapkan senyawa aktif kayu manis memiliki



aktivitas inhibisi lebih baik dari inhibitor poten CD36 yang sudah ada sehinggameningkatkan daya guna kayu manis sebagai alternatif lain obat untuk menghambat penuaan sel kulit berlebih melalui penghambatan *cellular senescence*.

METOLOGI PENELITIAN

Studi Pustaka dan Pengumpulan Data

Studi pustaka dilakukan dari jurnal terindeks Scopus dengan kata kunci *Cinnamomum zeylanicum*, kayu manis, CD36, *Cellular Senescence*, dan anti *senescence*. Data struktur protein CD36 dikumpulkan dari database PDB, diunduh, dan disimpan dalam format “.pdb”. Data struktur SMILES dan IC₅₀ senyawa inhibitor CD36 yang sudah ada dikumpulkan melalui pangkalan data ChEMBL. Senyawa aktif kayu manis dan analisis metabolit sekunder dicari dengan studi literatur, data ekspresi dan profil CD36 pada sel yang mengalami penuaan dicari dari CellAge, GeneCards, dan ProteinAtlas. Semua data diunduh dan disimpan dalam format “.csv”. Adapun data dari ProteinAtlas divisualisasikan kembali dengan aplikasi GraphPad 9.0.

Analisis *Prediction Score* dan Kesamaan Struktur dengan KNIME

Dari data ChEMBL, dicari senyawa inhibitor CD36 yang sudah diteliti dengan IC₅₀ terkecil, kemudian dibuat pemodelan inhibisi pada KNIME untuk perhitungan *prediction score*. Struktur SMILES senyawa aktif kayu manis

diinput dan dilihat *prediction score* paling tinggi. Struktur SMILES senyawa kayu manis dengan *prediction score* tertinggi kemudian diubah menjadi *fingerprint* untuk prediksi kesamaan struktur dengan inhibitor CD36 yang sudah dicari IC₅₀ yang paling kecil dalam rangka mengetahui arah aktivitasnya. Adapun nodus yang digunakan adalah alur kerja TeachOpenCADD [16].

Perbandingan Interaksi dan Aktivitas Senyawa Aktif *Cinnamomum zeylanicum* terhadap CD36 dan Inhibitor yang Sudah Diteliti

Interaksi antara CD36 dengan senyawa aktif kayu manis dianalisis dengan *molecular docking* menggunakan perangkat lunak Molecular Operating Environment (MOE) versi 2010.10 dengan lisensi dari Fakultas Farmasi UGM. *Docking* dilakukan sesuai dengan pengaturan bawaan dan beberapa pengaturan yang diadaptasi dari penelitian lain [17]. Struktur CD36 dicari dari database PDB dalam format PDB dan di-*docking* dengan pengaturan *docking* protein- ligan. Protein CD36 (PDB ID: 5LGD) dipersiapkan sebagai target dengan cara menghilangkan molekul air (HOH), menghilangkan domain PfEMP serta menambahkan proton [18]. Senyawa dibentuk dari *SMILES code* dan diminimalkan energinya menggunakan *MMFF94 force field*. Protokol *docking* meliputi *triangle matcher*, *forcefield*, dan *London dG* sebagai pengaturan *placement*, *refinement*, dan *scoring mode* secara



berturut-turut. Analisis interaksi dilakukan terhadap konformasi senyawa dengan skor *docking* terendah. Selanjutnya, dicari skor *docking* tertinggi, dicari domain interaksi, dan dilihat jenis interaksinya dengan protein CD36 dengan menu *Ligand Interaction*.

Penjabaran Mekanisme

Aktivitas Antipenuaan, Analisis Data, dan Visualisasi

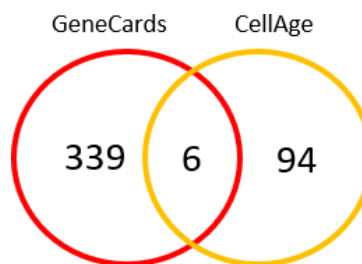
Dilakukan analisis data dan visualisasi dari InteractiVenn, GraphPad, dan studi literatur. Proses analisis data dilakukan dengan mengiriskan gen target senyawa kayu manis dan gen yang overekspresi pada sel mengalami penuaan dengan harapan didapatkan irisan target potensial senyawa di kayu manis pada sel yang mengalami penuaan. Nantinya dengan studi literatur dan STRING, akan dipelajari lebih lanjut peran-peran gen tersebut. Studi literatur dilakukan dari jurnal terindeks SCOPUS dengan kata kunci *cinnamaldehyde*, *eugenol*, *camphor*, *CD36*, dan *senescence*.

HASIL

Ekspresi Protein CD36 pada Sel Kulit yang Mengalami Penuaan

Dilakukan pencarian gen yang mengalami overekspresi pada sel yang mengalami penuaan sel dari dua pangkalan data: GeneCards dan CellAge. Dari pangkalan data GeneCards diambil 393 gen yang mengalami overekspresi pada kulit (skor relevansi lebih besar dari kuartil atas sebesar 8,43), sedangkan dari CellAge,

diambil 100 besar gen yang mengalami overekspresi pada sel yang mengalami

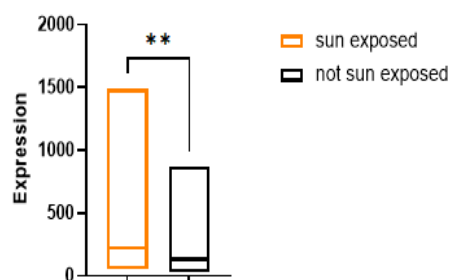


penuaan secara keseluruhan. Hasilnya, CD36 termasuk gen yang mengalami ekspresi berlebihan pada sel yang mengalami penuaan.

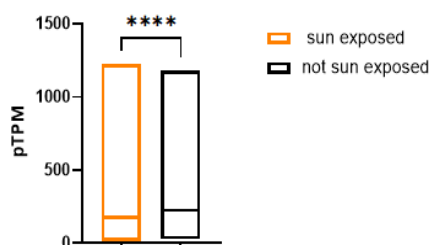
Gambar 1. Irisan gen yang overekspresi dari pangkalan data CellAge dan GeneCards.

Data dari ProteinAtlas menunjukkan bahwa CD36 terekspresi berlebih secara signifikan ketika terkena sinar UV seperti pada gambar 2 dan 3.

CD36 Expression in Female Skin Tissues

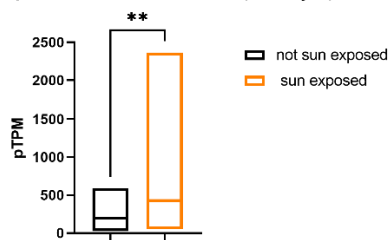


CD36 Expression in Male Skin Tissues

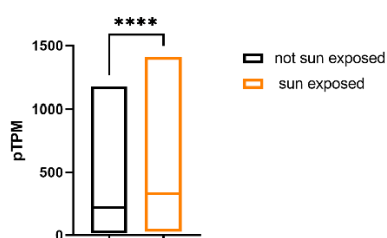


Gambar 2. Diagram batang ekspresi CD36 di sel keratinosit basal kulit sebelum dan sesudah terekspos sinar UV pada pria ($P < 0,001$) dan wanita ($P < 0,05$) dari pangkalan data ProteinAtlas.

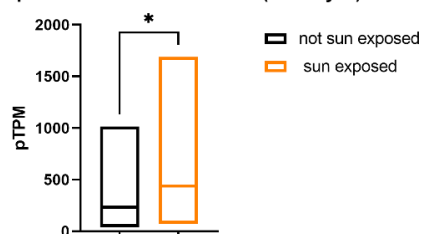
CD36 Expression in Skin Tissues (30-39 yrs)



CD36 Expression in Skin Tissues (50-59 yrs)



CD36 Expression in Skin Tissues (70-79 yrs)



Gambar 3. Diagram batang ekspresi CD36 di sel keratinosit basal kulit sebelum dan sesudah terekspos sinar UV pada kelompok umur 30-39 ($P < 0,05$); 50-59 ($P < 0,001$) dan 70-79 tahun ($P < 0,02$) dari pangkalan data ProteinAtlas.

Dari diagram batang, ekspresi CD36 meningkat signifikan pada pria dan wanita. Selain itu, menaikkan ekspresi CD36 akibat sinar UV signifikan seiring dengan menuanya usia sehingga CD36 dapat dijadikan target antipenuaan sel yang potensial.

Data Inhibitor CD36

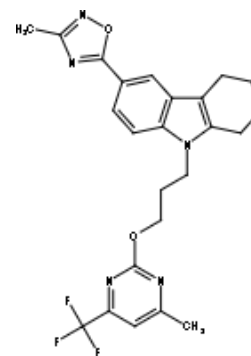
Inhibitor CD36 diperoleh dari pangkalan data ChEMBL (pangkalan data terkurasi yang memuat data molekul bioaktif yang memiliki sifat farmakologis dan informasi mekanisme kerja senyawa tersebut).

Data yang didapatkan dari proses pengurutan kekuatan inhibitor yang sudah ada tercantum dalam tabel 1.

Tabel 1. Inhibitor dari database ChEMBL yang sudah ada beserta kekuatannya

Senyawa	IC ₅₀	Publikasi
ChEMBL 2179501	1,5 nM	Mittapalli dkk, 2012
ChEMBL 2179106	5,0 nM	Mittapalli dkk, 2012
ChEMBL 2179497	5,0 nM	Mittapalli dkk, 2012

Dari pengurutan yang telah dilakukan, diketahui senyawa yang paling poten menghambat CD36 adalah senyawa turunan oxadiazole yang memiliki nama IUPAC 3- methyl-5-[9-[3- [4-methyl-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl]oxypropyl]-5,6,7,8-tetrahydrocarbazol-3-yl]-1,2,4-oxadiazole (ChEMBL 2179501) dengan nilai IC₅₀ sebanyak 1,5 nM.



Gambar 4. Struktur ChEMBL 2179501 yang didapat dari pangkalan data PubChem

Inhibitor CD36 yang sudah ada contohnya ChEMBL 2179501 yang hanya menghambat CD36 saja dan tidak menarget gen regulator CD36 [19]. Oleh karena itu masih ada kemungkinan CD36 untuk tereksresi berlebihan.

Potensi Senyawa Aktif pada Kayu Manis dalam Menginhibisi Protein CD36

Senyawa dominan pada kayu manis yaitu *cinnamaldehyde*, eugenol serta *camphor* pada daunnya diujikan potensi inhibisinya dengan pemodelan IC_{50} pada aplikasi KNIME untuk menemukan

prediksi aktivitas inhibisi dari senyawa-senyawa tersebut. *Machine learning random forest* digunakan untuk melakukan prediksi potensi senyawa kayu manis dalam menghambat CD36 yang hasilnya tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis data skor prediksi penghambatan dari aplikasi KNIME dengan *machine learning random forest*.

Senyawa	Prediction	Prediction Confidence
<i>Cinnamaldehyde</i>	1,00	0,93
Eugenol	1,00	0,82
<i>Camphor</i>	1,00	0,72

Investigasi *machine learning random forest* menunjukkan bahwa diantara senyawa lain, *cinnamaldehyde* memiliki korelasi dan kekuatan tertinggi yang menunjukkan bahwa *cinnamaldehyde* paling sesuai dengan model inhibisi CD36 yang sudah dibuat. Dengan kata lain, aktivitas *cinnamaldehyde* pada CD36 adalah aktivitas inhibisi, bukan mengaktivasi CD36.

Perbandingan Aktivitas Senyawa Aktif Kayu Manis terhadap CD36 dan Inhibitor yang Sudah Diteliti

Dilakukan pencarian arah aktivitas

cinnamaldehyde (senyawa dengan prediksi tertinggi untuk menghambat CD36) dengan aplikasi KNIME dan aktivitas inhibisi yang mungkin terjadi antara *cinnamaldehyde* dengan protein CD36 dengan simulasi *molecular docking* dengan *software* MOE (lisensi dari Fakultas Farmasi UGM). Arah aktivitas CD36 oleh *cinnamaldehyde* diketahui dengan membandingkan struktur *cinnamaldehyde* dengan inhibitor yang diketahui dari pangkalan data ChEMBL yaitu ChEMBL 2179501. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Skor tanimoto dan *DICE* senyawa *cinnamaldehyde* dengan aplikasi KNIME

Senyawa	Skor Tanimoto	Skor DICE
<i>Cinnamaldehyde</i>	0,886	0,939

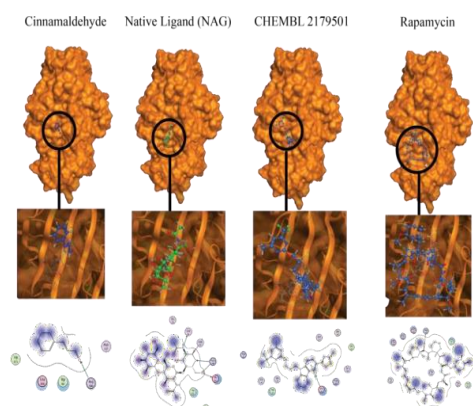
Selanjutnya, dilakukan *docking* antara *cinnamaldehyde* dan CD36. *Native ligand* protein CD36, NAG (N-Asetilglukosamin), dibuat sebagai

pembandingan. Selain NAG, digunakan juga inhibitor CD36 yang ditemukan dari ChEMBL dan Rapamycin sebagai obat antipenuaan yang sudah ada.



Visualisasi interaksi semua senyawa dapat dilihat pada gambar 5 dan tabel 4.

Gambar 5. Visualisasi *Molecular Docking* menggunakan aplikasi MOE.



Tabel 4. Interaksi molekuler *native ligand*, *cinnamaldehyde*, inhibitor ChEMBL 219501, dan Rapamycin dengan CD36. Interaksi dilihat pada aplikasi MOE

Senyawa	Skor <i>Docking</i> (kcal/mol)	RMSD (Å)	Asam Amino
Cinnamaldehyde	-7,43	0,87	ARG 386
NAG	-5,76	1,93	GLN 64, ASN 417, ARG 386, GLU 366
ChEMBL 2179501	-5,79	1,77	GLU 366
Rapamycin	-5,67	1,68	ARG 386

Keterangan tabel: ARG : Arginin; GLN : Glisin; ASN : Asparagin ; GLU : Glutamin. RMSD : *Root Mean Square Deviation*.

Menurut gambar 5 dan tabel 4, hasil *molecular docking* juga menunjukkan aktivitas inhibisi *cinnamaldehyde*. *Cinnamaldehyde* mempunyai afinitas yang jauh lebih kuat dan energi (ditunjukkan dengan skor *dock*) yang dibutuhkan yang lebih kecil dari *native ligand* (N- Asetilglukosamin), senyawa turunan oxadiazol, dan Rapamycin untuk berinteraksi dengan reseptor. Afinitas yang tinggi bagi inhibitor sangat dibutuhkan karena semakin kuat afinitasnya, semakin spesifik senyawa tersebut terhadap targetnya sehingga

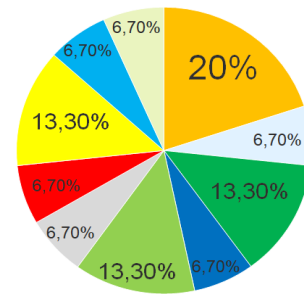
mengurangi ketidakelektifan penghambatan yang bisa saja menimbulkan efek yang tidak diinginkan [20]. Selain itu, diperlukan juga energi yang seminimal mungkin bagi inhibitor untuk menghambat CD36. Parameter ini dilihat dari *docking score* (S). *Docking score* dihitung dari kebutuhan ΔG *binding* (energi bebas) dengan rumus : ΔG *binding* = ΔG *solvent* + ΔG *complex formation* + ΔG *interaction* + ΔG *motion* [21]. Bila ΔG *binding* negatif, maka interaksi ligan-reseptor lebih spontan dan mudah terjadi. Skor *docking* yang makin kecil menandakan interaksi

protein- reseptor atau senyawa-reseptor semakin mudah terjadi [21]. Sebagai tambahan, asam amino, atom ligan, dan jenis interaksi dari *cinnamaldehyde* memiliki kesamaan dengan Rapamycin dan *Native Ligand* pada CD36 yang makin menegaskan aktivitas *cinnamaldehyde* sebagai inhibitor kompetitif. Jarak senyawa (*distance*) *cinnamaldehyde* yang lebih dekat juga memberikan keuntungan dalam menghambat CD36 lebih cepat, sehingga sapat disimpulkan bahwa *cinnamaldehyde* adalah inhibitor kompetitif CD36 yang diprediksi lebih baik dari senyawa lainnya.

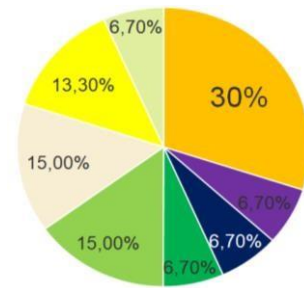
Interaksi, Aktivitas & Mekanisme Senyawa Kayu Manis terhadap Protein dalam Menghambat Penuaan Sel

Inhibisi terhadap CD36 memang penting untuk menghambat penuaan. Namun, untuk menangkal kemungkinan CD36 mengalami overekspresi lagi, protein regulator CD36 dan faktor penyebab overekspresi seperti ROS juga sebaiknya ditarget untuk dihambat aktivitasnya.

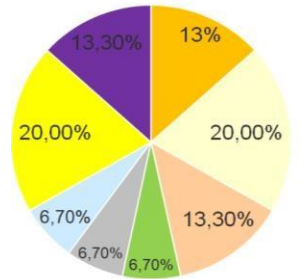
Diujikan aktivitas tiga senyawa dengan kelimpahan terbesar dalam kayu manis dengan protein yang ditarget dengan pangkalan data SwissTarget. Protein yang memiliki probabilitas prediksi terbesar sebagai target masing-masing senyawa dalam kayu manis dikelompokkan dalam beberapa kelas yang disajikan dalam gambar 6.



Cinnamaldehyde (A)



Eugenol (B)



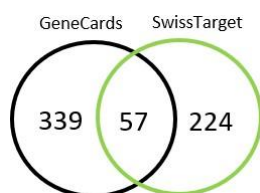
Camphor (C)

- | | |
|--|---|
| ■ Oxidoreductase | ■ Surface antigen |
| ■ Eraser | ■ Voltage-Gated Ion Channel |
| ■ Lyase | ■ Toll-Like Receptor |
| ■ G-Protein Coupled Receptor | ■ Ligand-Gated Ion Channel |
| ■ Cytochrome P450 | ■ Transcription Factor |
| ■ Enzyme | |
| ■ Kinase | |
| ■ Secreted Protein | |
| ■ PPAR | |
| ■ Protease | |

Gambar 6. Persentase aktivitas senyawa *cinnamaldehyde* (A), eugenol (B), *camphor* (C). Diagram lingkaran memuat lima belas protein target dengan probabilitas tertinggi diperoleh dari platform SwissTargetPrediction.

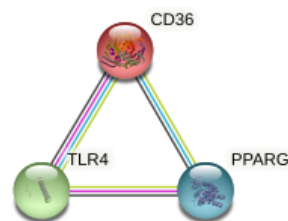
Kelas-kelas protein target tersebut mengindikasikan bahwa aktivitas yang dominan dari 3 senyawa dengan kelimpahan terbesar proses oksidasi-reduksi di dalam tubuh dan kelas protein PPAR. Selain itu, senyawa aktif kayu manis juga menarget *Toll-Like Receptor* (TLR).

Selanjutnya, dilakukan pengirisan gen target senyawa kayu manis dengan gen overekspresi pada sel yang menua melalui perangkat lunak InteractiVenn. Gen target dari kayu manis diperoleh dari pangkalan data SwissTarget sementara data gen overekspresi pada sel yang menua diperoleh dari GeneCards dengan batasan skor relevansi lebih besar dari kuartil atas sebesar 8,43. Diperoleh 57 gen yang beririsan termasuk diantaranya kelas PPAR (PPAR γ) dan TLR (TLR 4).



Gambar 7. Irisan gen target senyawa kayu manis dan gen yang overekspresi pada sel yang mengalami penuaan

Pangkalan data STRING menunjukkan interaksi protein CD36 dengan protein-protein lain. Untuk mendapatkan data yang lebih valid, digunakan parameter skor interaksi $>0,9$ (*highest confidence*). Diperoleh protein PPAR γ atau PPAR-Gamma (skor 0,951; regulator CD36), dan TLR 4 (0,944; koekspresi CD36).



Gambar 8. Interaksi CD36 dengan protein- protein lain dengan pangkalan data STRING.

PEMBAHASAN

Cellular senescence atau penuaan sel adalah *cell cycle arrest* yang irreversibel [22]. Penuaan sel ini dipicu oleh beberapa hal seperti kerusakan DNA, stress oksidatif, senyawa kimia, dan akumulasi lipid berlebih [5,23]. Salah satu tanda molekuler sel yang mengalami penuaan dini adalah dengan adanya SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) [24]. *Cluster Difference 36* atau CD36 adalah protein membran kelas yang dapat menghasilkan ROS, menginduksi produksi SASP, dan menyebabkan akumulasi lipid pada sel [13,25,26]. Pada sel keratinosit kulit, produksi ROS dan SASP berlebihan oleh CD36 seperti menyebabkan sel kulit terindikasi mengalami penuaan lebih cepat. Bila sel keratinosit pada kulit mengalami penuaan, plastisitas sel kulit akan berkurang [27]. Adapun akumulasi sel kulit yang menua mempercepat penuaan kulit secara keseluruhan [28]. Maka dapat dikatakan bahwa CD36 adalah protein yang berperan pada penuaan sel. Diperlukan senyawa inhibitor CD36 yang memiliki sifat antioksidan untuk menekan level ROS serta sifat antipenuaan sel. Senyawa ini diharapkan juga mampu menghambat

CD36 dan menghentikan ekspresi CD36 yang berlebihan untuk mencegah penuaan sel kulit.

Untuk pencegahan penuaan sel secara umum, digunakan Rapamycin yang bekerja pada kompleks protein mTOR (*mammalian* TOR). Akan tetapi, Rapamycin juga mendisrupsi kompleks protein mTOR kedua (mTORC2) yang mengakibatkan turunnya toleransi glukosa dan berkurangnya sensitivitas insulin sehingga menimbulkan resistensi insulin [29]. Selain itu, umumnya digunakan retinol untuk mencegah penuaan kulit secara lokal, tetapi retinol rentan menyebabkan iritasi pada kulit [10]. Kelemahan- kelemahan obat yang sudah ada inilah yang membuat agen antipenuaan kulit melalui pencegahan *cellular senescence* harus dikembangkan lebih lanjut.

Senyawa dominan pada kayu manis (*Cinnamomum verum*) yaitu *cinnamaldehyde* dan eugenol pada kulit batang, serta *camphor* pada daunnya [30]. Pada studi terdahulu, selain sebagai antioksidan dan antipenuaan sel [14], kayu manis terbukti mengurangi gula puasa sebanyak 18-29%, penderita diabetes tipe 2 setelah mengonsumsi 1-6 gram kayu manis per hari selama 40 hari [31]. Jadi, senyawa aktif kayu manis tidak menimbulkan resistensi insulin seperti Rapamycin pada penjelasan sebelumnya. Mikroemulsi minyak kayu manis juga diketahui tidak menyebabkan iritasi pada kulit manusia [32].

Untuk memilih senyawa kayu manis yang paling potensial sebagai inhibitor CD36, dilakukan analisis komputasi dengan KNIME. Analisis komputasi untuk prediksi arah aktivitas senyawa terhadap suatu protein dilakukan dengan metode *random forest*.

Metode *Random Forest* merupakan salah satu metode dalam *machine learning* yang bekerja dengan cara membuat diagram alir seperti pohon yang memiliki sebuah *root node* yang digunakan untuk mengumpulkan data. Setelah itu, *random forest* mengklasifikasikan suatu sampel data yang belum diketahui kelasnya ke dalam kelas – kelas yang ada. *Random forest* adalah kombinasi dari masing - masing pohon yang baik kemudian dikombinasikan ke dalam satu model [33]. Dalam konteks penelitian ini, model yang digunakan adalah model senyawa inhibitor CD36. Setelah itu, *random forest* akan memperkirakan kekuatan dan korelasi variabel input terhadap model yang ada [33]. Penggunaan *random forest* dapat menghindari *overfitting* (tidak akurat) pada sebuah set data saat mencapai akurasi yang maksimum [34]. Selain itu, *random forest* adalah *machine learning* dengan bias yang paling kecil dan paling akurat untuk penelitian QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) [35]. Dari ketiga senyawa yang diambil (*cinnamaldehyde*, eugenol, dan *camphor*), ditunjukkan bahwa senyawa *cinnamaldehyde* memiliki kemiripan tertinggi dengan



inhibitor CD36 dan paling potensial untuk menjadi inhibitor CD36 dibanding kedua senyawa lainnya.

Pemilihan senyawa yang paling potensial saja tidak cukup. Arah aktivitas *cinnamaldehyde* harus benar benar dipastikan. Perbandingan struktur perlu dilakukan karena semakin mirip struktur *cinnamaldehyde* dengan senyawa inhibitor, semakin mirip pula aktivitas biologisnya sebagai inhibitor [36]. Persamaan dilakukan dengan membandingkan koefisien DICE dan Tanimoto dari *cinnamaldehyde* dan ChEMBL 2179501. Koefisien DICE merupakan salah satu ukuran kemiripan dalam *informational retrieval* yang berguna untuk menghitung nilai kesamaan dua buah objek. Dokumen yang di-*retrieve* atau dikembalikan merupakan hasil pengukuran antara senyawa *query* (senyawa yang dijadikan pembanding) dan senyawa yang di-*input*-kan ke dalam pemodelan [37]. Adapun skor Tanimoto mendeteksi kesamaan dua senyawa dengan melihat kesamaan *fingerprint*-nya [38]. Diperoleh hasil skor tanimoto dan DICE yang mendekati 1. Artinya, seperti yang terlihat pada tabel 4, *cinnamaldehyde* memang benar benar berperan sebagai inhibitor CD36.

Mekanisme molekuler CD36 dalam memicu penuaan sel adalah sebagai berikut.

Jika aktivator Amiloid Beta ($A\beta$) diterima CD36, hal ini akan menyebabkan produksi ROS di dalam sel yang berkontribusi dominan pada percepatan penuaan sel melalui aktivasi Src kinase, Lyn, dan Fyn [39]. Selain itu, jika aktivator ox-LDL berlebih yang masuk melalui CD36, akan terjadi kerusakan bagian krista pada mitokondria yang berakibat pada kurang efektifnya fosforilasi oksidatif [25]. Kurang efektifnya fosforilasi oksidatif menyebabkan makin banyaknya produk oksidasi yang tidak sempurna yaitu ROS [40]. ROS akan menimbulkan regulasi positif bagi CD36 [12]. Akibatnya CD36 akan terekspresi lebih banyak lagi pada membran sel dan melakukan produksi ROS yang mempercepat penuaan sel. CD36 juga diketahui memproduksi SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) dengan jalur Src-MAPK-NF- κ B [13].

Melalui studi *docking* dan KNIME pada hasil sebelumnya, *cinnamaldehyde* menghambat CD36 sehingga tidak terjadi penerimaan aktivator yang menyebabkan penuaan sel berlangsung dengan cepat dan penstabilan keadaan penuaan sel. Inhibisi CD36 juga akan menggagalkan koekspresi reseptor TLR4 dengan CD36 akan dan mencegah aktivasi NF- κ B sehingga menurunkan produksi SASP [41]. Selain itu, *cinnamaldehyde* juga menurunkan regulasi gen pengeksresi CD36 yaitu PPAR γ dan mengurangi akumulasi lipid berlebih pada sel [42]. Turunnya regulasi

PPAR γ mengurangi regulasi CD36 dan mengurangi juga peluang terjadinya ekspresi CD36 yang berlebihan.

Senyawa dominan kayu manis lain seperti eugenol dan *camphor* juga dikenal mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat sehingga ROS berlebih pada sel penyebab penuaan sel dapat ditekan [43,44]. Dari hasil yang didapat, senyawa-senyawa pada *Cinnamomum zeylanicum* bekerja secara sinergis dalam menghambat penuaan kulit dengan menginhibisi CD36, mengatur regulasi CD36, dan menurunkan faktor-faktor yang mempercepat penuaan sel berlebih seperti ROS dan SASP.

KESIMPULAN

Senyawa pada *Cinnamomum zeylanicum* diprediksi bekerja secara sinergis untuk menghambat penuaan dini berlebih (*cellular senescence*) yang berakibat pada penuaan sel kulit dengan inhibisi CD36 dan mengeliminasi faktor faktor penuaan seperti overekspresi CD36 berlebih, akumulasi ROS (*Reactive Oxygen Species*), lemak, dan SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*).

SARAN

Perlu dilakukan penelitian *in vivo* dan *in vitro* untuk membuktikan lebih lanjut efek dari *Cinnamomum zeylanicum* untuk mencegah *cellular senescence*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan pada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang

telah mendukung jalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;1(1):72–6.
2. Palmer AK, Gustafson B, Kirkland JL, Smith U. Cellular senescence: At the Nexus Between Ageing and Diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(10):1835–41.
3. Weinmüller R, Zbiral B, Becirovic A, Stelzer EM, Nagelreiter F, Schosserer M, et al. Organotypic human skin culture models constructed with senescent fibroblasts show hallmarks of Skin aging. *npj Aging and Mechanisms of Disease*. 2020;6(1).
4. Bellei B, Picardo M. Premature cell senescence in human skin: Dual face in chronic acquired Pigmentary Disorders. *Ageing Research Reviews*. 2020;57:100981.
5. Martens DS, Nawrot TS. Air Pollution Stress and the aging phenotype: The Telomere Connection. *Current Environmental Health Reports*. 2016;3(3):258–69.
6. Lizardo DY, Lin Y-L, Gokcumen O, Atilla-Gokcumen GE. Regulation of lipids is central to replicative senescence. *Molecular BioSystems*. 2017;13(3):498–509.
7. Pulakat L, Chen HH. Pro-Senescence and anti-senescence mechanisms of cardiovascular aging: Cardiac microRNA regulation of longevity drug-induced autophagy. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11.
8. Xu S., Cai Y., dan Wei Y. MTOR signaling from cellular senescence to organismal aging. *Aging and Disease*. 2014.
9. Fischer KE, Gelfond JA, Soto VY, Han C, Someya S, Richardson A, et al. Health effects of long-term rapamycin treatment: The impact on Mouse Health of enteric rapamycin treatment from four months of age throughout life. *PLOS ONE*



- 2015;10(5).
10. Kim B, Lee YS, dan Kang KS. The mechanism of retinol-induced irritation and its application to anti-irritant development. *Toxicology Letters*. 2003;146(1):65–73.
 11. Drews A, Flint J, Shivji N, Jönsson P, Wirthensohn D, De Genst E, et al. Individual aggregates of amyloid beta induce temporary calcium influx through the cell membrane of neuronal cells. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
 12. Santos R, Ruiz de Almodóvar C, Bulteau A- L, Gomes CM. Neurodegeneration, neurogenesis, and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1–2.
 13. Chong M, Yin T, Chen R, Xiang H, Yuan L, Ding Y, et al. CD 36 initiates the secretory phenotype during the establishment of cellular senescence. *EMBO reports*. 2018;19(6).
 14. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014:1–12.
 15. Rajamani K, Lin Y-C, Wen T-C, Hsieh J, Subeq Y-M, Liu J-W, et al. The antisenescence effect of trans-cinnamaldehyde on adipose-derived Stem Cells. *Cell Transplantation*. 2015;24(3):493–507.
 16. Sydow D, Morger A, Driller M, Volkamer A. TeachOpenCADD: A teaching platform for computer-aided drug design using open source packages and Data. *Journal of Cheminformatics*. 2019;11(1).
 17. Hermawan A, Putri H, Hanif N, Ikawati M. Integrative Bioinformatics Study of Tangeretin potential targets for preventing metastatic breast cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021:1–15.
 18. Vazquez MM, Gutierrez MV, Salvatore SR, Puiatti M, Dato VA, Chiabrando GA, et al. Nitro-oleic acid, a ligand of CD36, reduces cholesterol accumulation by modulating oxidized-LDL uptake and cholesterol efflux in raw264.7 macrophages. *Redox Biology*. 2020;36:101591.
 19. Mittapalli GK, Zhao F, Jackson A, Gao H, Lee H, Chow S, et al. Discovery of ITX 4520: A highly potent orally bioavailable hepatitis C virus entry inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012;22(15):4955–61.
 20. Eaton BE, Gold L, Zichi DA. Let's get specific: The relationship between specificity and affinity. *Chemistry & Biology*. 1995;2(10):633–8.
 21. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*. 2011;7(2):146–57.
 22. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence: Figure 1. *Genes & Development*. 2010;24(22):2463–79.
 23. Flor AC, Wolfgeher D, Wu D, Kron SJ. A signature of enhanced lipid metabolism, lipid peroxidation and aldehyde stress in therapy-induced senescence. *Cell Death Discovery*. 2017;3(1).
 24. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(9):729–40.
 25. Chen Y, Yang M, Huang W, Chen W, Zhao Y, Schulte ML, et al. Mitochondrial metabolic reprogramming by CD36 signaling drives macrophage inflammatory responses. *Circulation Research*. 2019;125(12):1087–102.
 26. Angin Y, Steinbusch LKM, Simons PJ, Greulich S, Hoebbers NTH, Douma K, et al. CD36 inhibition prevents lipid accumulation and contractile dysfunction in rat cardiomyocytes. *Biochemical Journal*. 2012;448(1):43–53.
 27. Gruber F, Kremsehner C, Eckhart L, Tschachler E. Cell aging and cellular senescence in skin aging — recent advances in fibroblast and keratinocyte biology. *Experimental Gerontology*. 2020;130:110780.
 28. Wlaschek M, Maity P,



- Makrantonaki E, Scharffetter-Kochanek K. Connective tissue and fibroblast senescence in skin aging. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021;141(4):985–92.
29. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mtorc2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 2012;335(6076):1638–43.
 30. Vangalapati, M, Sree,S.N., Surya, P.D.V., dan Sumanjali, A. A Review on Pharmacological Activities and Clinical effects of Cinnamon Species. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2012; 3 (1): 653.
 31. Anderson RA. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2008;67(1):48–53.
 32. Ghosh V, Saranya S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;105:152–7.
 33. Talevi A, Morales JF, Hather G, Podichetty JT, Kim S, Bloomingdale PC, et al. Machine learning in drug discovery and development part 1: A Primer. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2020;9(3):129–42.
 34. Breiman L. *Machine Learning*. 2001;45(1):5–32.
 35. Svetnik V, Liaw A, Tong C, Culberson JC, Sheridan RP, Feuston BP. Random ForestA classification and regression tool for compound classification and QSAR modeling. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 2003;43(6):1947– 58.
 36. Bajorath J. Molecular similarity concepts for informatics applications. *Methods in Molecular Biology*. 2016;:231–45.
 37. Prasetyo VR, Hartanto B, Mulyono AA. Penentuan Pembimbing Tugas Akhir Mahasiswa Jurusan teknik informatika Universitas Surabaya dengan metode dice coefficient. *Teknika*. 2019;8(1):44–51.
 38. Bajusz D, Rácz A, Héberger K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics*. 2015;7(1).
 39. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, et al. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of β -amyloid. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(49):47373–9.
 40. Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2017;8.
 41. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*. 2009;11(2):155–61.
 42. Huang B, Yuan HD, Kim DY, Quan HY, Chung SH. Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator- activated receptor- γ (PPAR γ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(8):3666–73.
 43. Gülçin İ. Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*. 2011;14(9):975– 85.
 44. Tran TA, Ho MT, Song YW, Cho M, Cho SK. Camphor induces proliferative and anti- senescence activities in human primary dermal fibroblasts and inhibits UV-induced wrinkle formation in Mouse skin. *Phytotherapy Research*. 2015;29(12):1917– 25.