

Virtual Docking Kandungan Senyawa Daun Sangketan (*Achyranthes aspera*) dan Adas Bintang (*Anisi Stellati Fructus*) terhadap Protein *dihydrofolate reductase* Memanfaatkan PyRx-vina

Aulia Rahman¹, Broto Santoso²

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

¹Email: Auliarahman140029@gmail.com

²Email: broto.santoso@ums.ac.id

Abstrak

Kata Kunci:
PyRx-vina;
Mycobacterium
tuberculosis;
ligand native;
docking

Pengembangan obat baru dengan initial docking senyawa alam dari tanaman yang memiliki potensi sebagai obat untuk TB menjadi salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mencegah masalah MDR-TB. Analisis docking telah dilakukan berdasarkan perolehan binding affinity dan hasil interaksi ligand-protein menggunakan PyRx-vina, PLIP dan PyMOL. Skor binding affinity terbaik dari senyawa adas bintang dan daun sangketan secara berurutan adalah -6,5 kkal/mol (mol000561) dan -6,6 kkal/mol (mol000511). Hasil ini lebih baik apabila dibandingkan dengan yang diperoleh oleh ligand native, yaitu -4,3 kkal/mol. Nilai binding affinity yang lebih kecil ini, menunjukkan bahwa senyawa target dari adas bintang dan daun sangketan lebih mudah berikatan pada protein target TBC 4KL9 karena energi yang dibutuhkan untuk berikatan lebih kecil. Energi yang lebih kecil ini memungkinkan senyawa target digunakan untuk menargetkan protein target TBC 4KL9. Hasil visualisasi dengan PLIP menunjukkan adanya kesamaan interaksi antara ligand native dan molekul target yaitu ikatan hidrofobik pada 8GLN dan 131LEU. Kesamaan interaksi ini menunjukkan bahwa senyawa target dapat berinteraksi dengan protein target TB 4KL9 pada kedua asam amino tersebut. Semakin banyak interaksi yang terjadi menunjukkan semakin poten pula senyawa target sebagai salah satu alternatif dalam pengobatan TB.

1. PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit TB sampai saat ini masih menjadi masalah yang serius di seluruh dunia karena tingkat mortalitas dan morbiditasnya yang tinggi. Menurut data dari *World Health Organization* (WHO), sampai 2015 TBC dan HIV merupakan penyebab kematian terbesar di seluruh dunia. TB telah membunuh sekitar 1,4 juta jiwa dan 10,4 juta telah terkena penyakit infeksi ini di tahun 2014 (Islam *et al.*, 2017; Subtil *et al.*, 2017).

Secara garis besar tingkat mortalitas dan morbiditas pada kasus TB memang sudah menurun seiring berjalannya waktu, tetapi tantangan lain yang muncul pada terapi TB adalah timbulnya Multiple Drug Resistant (MDR) dan Extensively Drug Resistant (XDR) tuberkulosis. MDR adalah kasus dimana pasien yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* mengalami resisten terhadap obat-obat utama dalam terapi TB seperti Rifampisin (RIF) dan Isoniazid (INH) (Sharifi-Rad *et al.*, 2017). Pengembangan obat baru dengan initial docking senyawa alam dari tanaman yang memiliki potensi sebagai obat untuk TB menjadi salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mencegah masalah MDR-TB.

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri yang menyebabkan terjadinya infeksi TB sekaligus target untuk pengobatan TB. Obat-obat yang digunakan dalam pengobatan TB harus dapat membunuh dan Menghambat atau menginhibisi aktivitas bakteri

tersebut (Anguru *et al.*, 2017; Ekins *et al.*, 2017). Salah satu target protein yang terdapat dalam *Mycobacterium tuberculosis* dan dapat digunakan untuk membuat inovasi pengobatan TB adalah *Dihydrofolate reductase (DHFR)*. Inhibitor pada enzim DHFR telah digunakan pada pengobatan beberapa penyakit seperti infeksi oleh bakteri, protozoa, dan jamur; dan penyakit yang disebabkan oleh autoimun seperti arthritis rheumatoid (Schweitzer, Dicker and Bertino, 1990).

Daun sengketan (*Achyranthes aspera*) merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai pengobatan di India, China, dan Bangladesh. Daun sengketan dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengobati gonorrhoea, dispepsia, demam, disentri, asma, diuretik, anti mikroba, anti inflamasi, mempunyai efek hipoglikemik dan antikarsinogenik (Kumar and Mishra, 2017; Kumar *et al.*, 2017), batuk, infeksi, malaria kronik, impoten, dan gigitan ular (Kumar and Londonkar, 2011). Secara kimia, daun sengketan mengandung terpenoid, saponin, *D-glucuronic acid*, asam oleanolat, *aglycone A,B,C*, dan *D*, *ecdisterone*, *betaine*, *17-penta triacantanol*. Daun sengketan memberikan aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S aureus*. Daun sengketan memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif pada konsentrasi tertinggi 50µg/mL (Srivastav *et al.*, 2011).

Adas bintang (*Anisi Stellati Fructus*) merupakan tanaman yang berasal dari China dan Vietnam. Adas bintang mengandung 5-9% minyak volatil, anethole, anisaldehyde, limonen, sesquiterpen, flavonoid, asam karboksilat, dan galokatekin. Adas bintang biasanya digunakan untuk mengobati gangguan pada saluran pernapasan dan saluran pencernaan seperti bronkitis, dispepsia, dan sebagai ekspektoran (Wichtl M., 2004).

Bedasarkan latar belakang diatas, untuk membuktikan aktivitas anti bakteri dari daun sengketan dan adas bintang terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada protein *Dihydrofolate reductase* perlu dilakukan analisis molekular *docking*. Analisis *docking* dilakukan dengan melihat hubungan interaksi antara ligand unik dari protein *Dihydrofolate reductase* dengan protein turunan dari daun sengketan dan adas bintang. Nilai *binding affinity* dengan angka terendah akan menunjukkan jumlah energi terkecil yang dibutuhkan untuk berikatan dengan protein target *Dihydrofolate reductase* sehingga memudahkan untuk menargetkan obat sehingga terapi TB bisa lebih efektif. Hasil tersebut akan membuka jalan baru bagi inovasi pada pengobatan TB serta pemanfaatan daun sengketan dan adas bintang di masa yang akan datang.

2. METODE

2.1. Alat dan Bahan

Perangkat komputer, Pyrx 0.9.7, Chimera 1.12, Microsoft Office Excel 2007, Editplus, PDBest, PyMol, dan PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler). Struktur Kimia Yang diuji dari turunan Daun Sengketan (*Achyranthes aspera*), Protein target dari *Mycobacterium tuberculosis (Dihydrofolate reductase)* yaitu 4KL9 dengan ligand unik P33 diperoleh dari rcsd.org (Berman, 2000).

2.2. Preparasi Sampel Protein *Dihydrofolate reductase*

Preparasi sampel protein *Dihydrofolate reductase* yaitu 4KL9 dengan ligand unik P33 dilakukan dengan memanfaatkan Editplus, PDBest, dan Chimera. Protein *Dihydrofolate reductase* yang telah diperoleh dari situs rcsd.org, kemudian dipreparasi menggunakan PDBest untuk menghilangkan ANISOU atau pengotor yang dapat membiaskan hasil dari virtual docking. Sampel *Dihydrofolate reductase* kemudian diisolasi untuk memisahkan antara protein dengan ligand uniknya menggunakan Chimera (Pettersen, 2004). Isolasi dilakukan dengan memisahkan *chain* dari protein *Dihydrofolate reductase* yang memiliki ligand unik P33. Isolasi dilanjutkan dengan memisahkan protein *Dihydrofolate reductase* dengan ligand uniknya dan pengotor lainnya seperti air.

2.3. Virtual Docking dengan memanfaatkan PyRx-Vina

Hasil isolasi dari chimera dimasukkan kedalam aplikasi Pyrx berupa protein dan ligand dari protein *Dihydrofolate reductase*. Proses virtual docking dijalankan dengan mencari pusat massa dari masing-masing ligand protein dan ligand dengan Microsoft Excel.

Penentuan pusat massa ligand atau *center of mass* (COM) dilakukan untuk memfokuskan virtual docking pada daerah yang terdapat ligand uniknya sehingga membuat waktu virtual docking lebih efisien dan hasil yang didapatkan lebih maksimal. Protein 4KL9 memiliki COM dengan koordinat x, y, z sebesar 0,568; 3,001; dan -0,241. Dimensi untuk gridbox keduanya diatur 20; 15; 15. Memanfaatkan fitur Vina-Autodock akan didapatkan nilai *Binding affinity* antara protein dan ligand unik dari protein *Dihydrofolate reductase* dengan molekul-molekul turunan dari daun sengketan dan adas bintang. Hasil dari Vina-Autodock akan dipilih 2 molekul dengan nilai *binding affinity* terendah dari daun sengketan dan adas bintang (Trott, 2010).

2.4. Visualisasi hasil Virtual Docking dengan PyMol dan PLIP

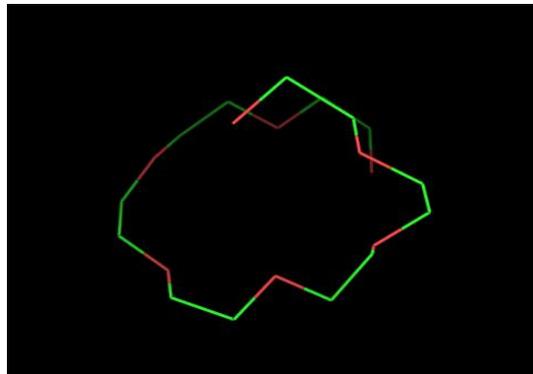
Proses selanjutnya adalah melakukan visualisasi terhadap hasil dari virtual docking menggunakan PyMol dan PLIP. Dua molekul dari daun sengketan dan adas bintang akan dihubungkan dengan protein *Dihydrofolate reductase* menggunakan PyMol yang kemudian akan dilihat adakah interaksi antara molekul turunan dari kedua tanaman dengan protein menggunakan PLIP (Salentin, 2015).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

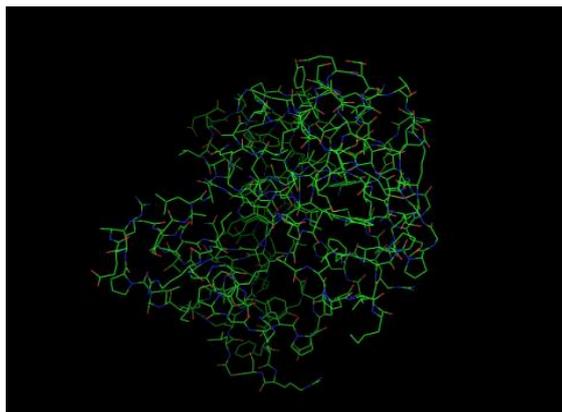
3.1. Hasil Preparasi Protein *Dihydrofolate reductase* menggunakan Chimera

Menggunakan perangkat komputasi Chimera, protein *Dihydrofolate reductase* akan dipreparasi dan diisolasi antara protein dan ligan uniknya yaitu P33. Chimera juga bisa digunakan untuk menghilangkan air dan pengotor lainnya yang dapat mebiaskan hasil virtual docking. Hal ini akan memberikan kemudahan dalam mengerjakan virtual docking menggunakan PyRx-VinaAutodock. Chimera juga dapat memberikan visualisasi secara 2D dan 3D seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 dan

Gambar 2.



Gambar 1. Ligan unik P33 hasil preparasi dari protein target TB-4KL9 dengan Chimera



Gambar 2. Protein 4KL9 hasil preparasi dengan Chimera

3.2. Hasil virtual Docking menggunakan PyRx-VinaAutodock

Virtual docking merupakan suatu pendekatan untuk memanfaatkan perangkat komputasi untuk mengembangkan pencarian obat-obat baru dari tanaman-tanaman yang memiliki potensi tersebut. Salah satu perangkat komputasi yang dapat dimanfaatkan untuk melakukan virtual docking adalah PyRx-VinaAutodock. PyRx-VinaAutodock akan memberikan hasil berupa nilai *Binding affinity* yang menunjukkan afinitas untuk berikatan antara senyawa turunan dari daun sengketa dan adas bintang dengan protein target TB yaitu *Dihydrofolate reductase*.

Nilai *Binding affinity* yang semakin rendah menunjukkan bahwa energi yang dibutuhkan bagi senyawa turunan turunan dari daun sengketa dan adas bintang dengan protein *Dihydrofolate reductase* semakin kecil, dan semakin mudah berikatan. Hal ini dapat dimanfaatkan untuk mentargetkan senyawa-senyawa tersebut pada protein *Dihydrofolate reductase* yang merupakan target dari penyakit TB.

Hasil *Binding affinity* dari senyawa turunan adas bintang dan daun sengketa lebih rendah bila dibandingkan dengan *ligand* nativenya. Hasil ini seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1. Skor *binding affinity* terbaik dari senyawa adas bintang dan daun sengketa secara berurutan adalah -6,5 kkal/mol (mol000561) dan -6,6 kkal/mol (mol000511). Hasil ini lebih baik apabila dibandingkan dengan yang diperoleh oleh *ligand* native, yaitu -4,3 kkal/mol. Nilai *Binding affinity* yang lebih rendah dari senyawa kedua tanaman menunjukkan bahwa keduanya lebih mudah berikatan dengan protein target TB *Dihydrofolate reductase*, sehingga dapat dikatakan keduanya lebih poten dibandingkan dengan *ligand* nativenya.

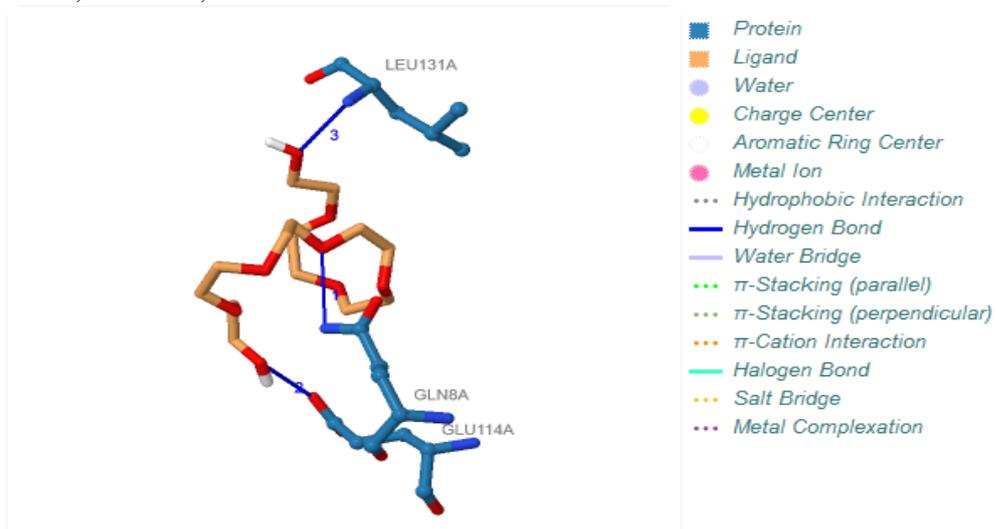
Tabel 1. Hasil *Virtual Docking* Menggunakan PyRx-VinaAutodock

	Nilai <i>Binding affinity</i> (kkal/mol)
Ligand native:	
4kl9_a_lig1	-4,3
Molekul turunan adas bintang:	
mol000561	-6,5
Molekul turunan daun sengketa:	
mol000511	-6,6

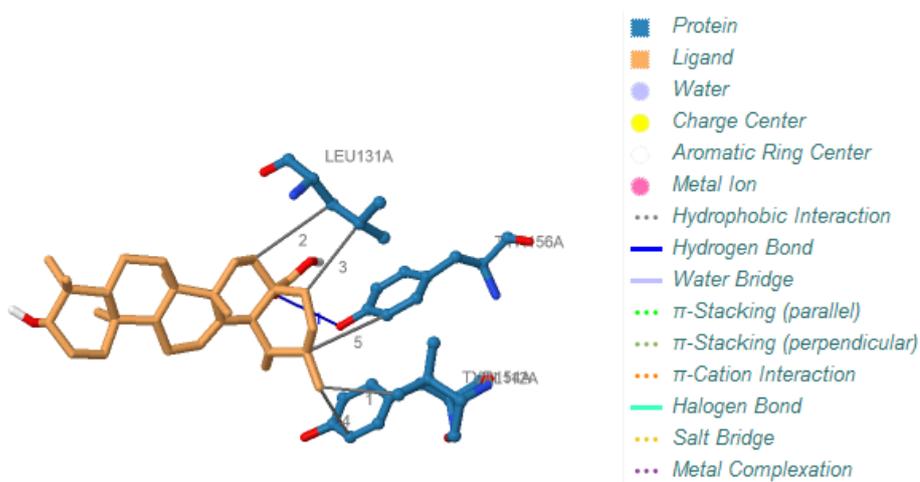
3.3. Hasil Visualisasi Hasil *Virtual Docking* Menggunakan PLIP

Proses visualisasi hasil virtual docking dilakukan dengan memanfaatkan perangkat komputasi PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler). Hasil visualisasi ini berupa jenis interaksi yang terjadi dan jenis asam amino yang terlibat dalam interaksi antara senyawa-senyawa turunan dari adas bintang dan daun sengketa dengan protein target TB *Dihydrofolate reductase*. PLIP juga bisa memberikan visualisasi berupa gambar 2D

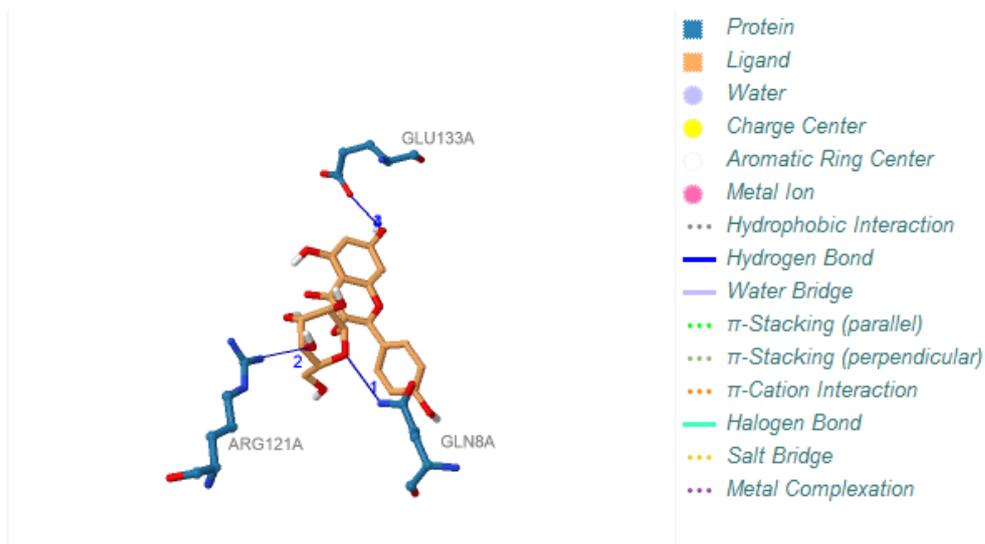
dan 3D untuk menggambarkan interaksi yang terjadi seperti ditunjukkan pada Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5.



Gambar 3. Visualisasi interaksi antara ligand native dengan protein 4KL9 dengan PLIP



Gambar 4. Visualisasi interaksi antara senyawa turunan daun sengketan (MOL000511) dengan protein 4KL9 dengan PLIP



Gambar 5. Visualisasi interaksi antara senyawa turunan adas bintang (MOL000561) dengan protein 4KL9 dengan PLIP

Hasil visualisasi dengan PLIP memberikan informasi mengenai jenis interaksi antara senyawa turunan dari adas bintang dan daun sengketa dengan protein target *Dihydrofolate reductase* dan asam amino yang terlibat sesuai dengan Gambar 4 dan Gambar 5. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa ada kesamaan jenis interaksi dan asam amino yang terlibat yaitu interaksi dengan ikatan hidrogen antara ligan native dan senyawa target dengan asam amino 8GLN dan 131LEU. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa turunan dari kedua jenis tanaman memiliki potensi sebagai obat untuk TB, karena dapat berikatan dengan protein target TB *Dihydrofolate reductase* bahkan dengan energi yang lebih rendah yang ditunjukkan oleh nilai *binding affinity* nya yang lebih rendah seperti pada Tabel 1. Senyawa target dari turunan daun sengketa bahkan memiliki jenis interaksi yang lebih banyak dibandingkan dengan ligan nativenya seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Senyawa ini mampu berikatan dengan mekanisme ikatan hidrogen pada asam amino 154TYR dan 131LEU dan ikatan hidrofobik pada asam amino 112VAL dan 154TYR. Semakin banyak jenis interaksi yang terjadi menunjukkan semakin banyak pula cara untuk menargetkan senyawa ini pada protein target TB-4KL9 dan interaksi yang terjadi pun akan semakin kuat.

Senyawa-senyawa turunan dari kedua tanaman juga diprediksi memiliki aksi farmakologis yang lebih poten dari ligan nativenya. Hal ini ditunjukkan dari lebih banyak jenis interaksi yang mungkin terjadi dan asam amino yang terlibat dari ligan nativenya, artinya bahwa senyawa-senyawa ini mampu berikatan pada lebih banyak *site* asam amino pada protein target TB *Dihydrofolate reductase* seperti yang ditunjukkan pada

Tabel 2.

Tabel 2. Jenis Interaksi Antara Molekul Turunan Tanaman dan Protein *Dihydrofolate reductase* Menggunakan PLIP

	Jenis Interaksi	Asam Amino
Ligand native: 4kl9_a_lig1	Ikatan hidrogen	8GLN , 24TRP, 27LEU, 30GLU, 114GLU, 131LEU
Molekul turunan adas bintang: mol000561	Ikatan hidrogen	8GLN , 121ARG, 133GLU

Molekul turunan daun

sengketan:

mol000511

Ikatan hidrogen

154TYR dan **131LEU**

Ikatan hidrofobik

112VAL dan 154TYR

4. KESIMPULAN

Senyawa-senyawa turunan dari adas bintang dan daun sengketan diprediksi memiliki aksi yang lebih poten sebagai obat untuk penyakit TB. Hal ini ditunjukkan dari nilai *binding affinity* yang lebih rendah dari ligand nativenya yaitu untuk senyawa adas bintang dan daun sengketan secara berurutan adalah -6,5 kkal/mol (mol000561) dan -6,6 kkal/mol (mol000511) sedangkan untuk *ligand* nativenya, yaitu -4,3 kkal/mol. Parameter lainnya yaitu dari jenis interaksi dan asam amino yang terlibat untuk berikatan lebih banyak. Sehingga senyawa-senyawa ini lebih mudah dalam berikatan dan mampu berikatan pada banyak *site* asam amino pada protein target TB *Dihydrofolate reductase*. Keuntungan ini dapat dimanfaatkan dengan mengoptimalkan senyawa turunan dari adas bintang dan daun sengketan sebagai alternatif dalam pengobatan TB.

REFERENSI

- Anguru, M. R. *et al.* (2017) 'Novel drug targets for Mycobacterium tuberculosis: 2-heterostyrylbenzimidazoles as inhibitors of cell wall protein synthesis', *Chemistry Central Journal*. Springer International Publishing, 11(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13065-017-0295-z.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, and B. P. (2000) 'The Protein Data Bank.', *Nucleic Acids Research.*, 28, pp. 235–242.
- Ekins, S. *et al.* (2017) 'Machine learning and docking models for Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I', *Tuberculosis*. Elsevier Ltd, 103, pp. 52–60. doi: 10.1016/j.tube.2017.01.005.
- Islam, M. M. *et al.* (2017) 'Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy', *Journal of Genetics and Genomics*. Elsevier Limited and Science Press, 44(1), pp. 21–37. doi: 10.1016/j.jgg.2016.10.002.
- Kumar, A. and Londonkar, R. (2011) 'Potential Antibacterial and Antifungal Activity of *Achyranthes aspera* L.', *Recent Research in Science and Technology*, 3(4), pp. 53–57.
- Kumar, A. and Mishra, K. K. (2017) 'Phytochemical & Pharmacognostical Profile of *Achyranthes aspera*', 6(5), pp. 394–398.
- Kumar, M. *et al.* (2017) 'Comparative evaluation of in vitro antibacterial activity of several extracts of *Achyranthes aspera*, *Azolla pinnata*, *Cissus quadrangularis* and *Tinospora cordifolia*', 5(1), pp. 154–157.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, F. TE (2004) 'UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis', *J Comput Chem*, 25(13), pp. 1605–12.
- Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, and S. M. (2015) 'PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler', *Nucl. Acids Res*, 43 (W1), pp. W443–W447. doi: 10.1093/nar/gkv315.

- Schweitzer, B. I., Dicker, A. P. and Bertino, J. R. (1990) 'Dihydrofolate reductase as a therapeutic target.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(8), pp. 2441–52.
- Sharifi-Rad, J. *et al.* (2017) 'Medicinal plants used in the treatment of tuberculosis - Ethnobotanical and ethnopharmacological approaches', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.001.
- Srivastav, S. *et al.* (2011) 'Achyranthes aspera-An important medicinal plant: A review', *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 1(1), pp. 1–14.
- Subtil, F. T. *et al.* (2017) 'Activity of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides in mycobacterium tuberculosis clinical isolates and identification of their molecular target by whole genome sequencing', *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.023.
- Trott O (2010) 'The Molecular Graphics Lab at The Scripps Research Institute – AutoDock Vina is an open-source program for doing molecular docking'.
- Wichtl M. (2004) *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*. CRC Press.