

Afinitas Ikatan Senyawa Dalam Kulit dan Biji Buah Jeruk Keprok serta Adas Bintang terhadap sintase III 3-oksoasil-[asil-carrier-protein] dan Reduktase Enoyl-ACP (InhA) *Myobacterium tuberculosis*

Prastiwi Wulaning Tyas^{1*}, Broto Santoso^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: prastiw4@gmail.com

*Email: broto.santoso@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:
Molecular
Docking,
Citrus reticulata,
3-oxoacyl-[acyl-
carrier-protein]
synthase III,
Enoyl-ACP
Reductase (InhA),
*Myobacterium
tuberculosis*.

Tuberculosis (TB) merupakan infectious killer yang disebabkan oleh Myobacterium tuberculosis. Temuan kasus TB hingga tahun 2015 di Indonesia berdasarkan case notification rate (CNR) sebesar 117 kasus per 100.000 penduduk. Infeksi bakteri Myobacterium tuberculosis dapat berkembang menjadi multi drug resistance (MDR). Peningkatan kasus MDR-TB menjadi perhatian penting karena jumlah kasus MDR-TB tidak sebanding dengan jumlah pasien yang terobati. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui afinitas ikatan ligan dari adas bintang, kulit buah dan biji buah jeruk keprok terhadap protein target 2x22 dan 1u6s. Studi Molecular docking difokuskan pada dua protein penting untuk Fatty acid synthesis (FAS) II M.tuberculosis yaitu Enoyl-ACP Reductase (InhA) sub unit 2x22 dan 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (FabH) sub unit 1u6s. Bagian ligan dan protein dipisahkan menggunakan software Chimera dan OpenBabel. Kedua protein tersebut dilakukan molecular docking dengan senyawa aktif turunan biji dan kulit buah jeruk keprok serta adas bintang. Software molecular docking yaitu PyRx 0.9.7 dengan metode Vina Autodock. Hasil Molecular docking diamati menggunakan protein-ligand interaction profiler (PLIP) dan Pymol. Molecular docking dilakukan untuk mengetahui binding affinity terbaik antara ligan dengan protein. Hasil analisis menunjukkan senyawa kaempferol dan mairin dalam adas bintang memiliki ikatan afinitas terhadap 1u6s dan 2x22 masing-masing -8,8 Kkal/mol dan -10,1 Kkal/mol. Senyawa mol001797 dan neohesperidin dalam kulit buah jeruk keprok memiliki ikatan afinitas terhadap 1u6s dan 2x22 masing-masing -8,0 Kkal/mol dan -9,9 Kkal/mol. Senyawa EIC dan asam zumarik dalam biji buah jeruk keprok memiliki ikatan afinitas terhadap 1u6s dan 2x22 masing-masing -6,9 Kkal/mol dan -6,8 Kkal/mol. Hasil analisis menunjukkan interaksi paling tinggi yaitu antara senyawa mairin dalam adas bintang dengan protein target Enoyl-ACP Reductase (InhA) sub unit 2x22 sebesar -10,1 Kkal/mol.

1. PENDAHULUAN

Tuberculosis (TB) merupakan *infectious killer* yang disebabkan oleh *Myobacterium tuberculosis*. Bakteri ini menyerang organ paru-paru, dimana penularannya melalui penghirupan droplet yang mengandung bakteri *Myobacterium tuberculosis* (Dipiro, 2008). Temuan kasus TB hingga tahun 2015 di Indonesia berdasarkan *case notification rate* (CNR) sebesar 117 kasus per 100.000 penduduk. Temuan kasus tersebut cenderung meningkat menjadi 14% dibandingkan tahun 2014 sebesar 10% (KemenKes RI, 2017). Infeksi bakteri

Mycobacterium tuberculosis dapat berkembang menjadi *multi drug resistance* (MDR) jika tidak ditangani lebih dini. Perkembangan antibiotik saat ini tidak sebanding dengan perkembangan penyakit TB. Hal ini ditunjukkan dari peningkatan kasus terduga MDR dari tahun 2014 sebanyak 9.399 kasus menjadi 15.380 kasus pada tahun 2015. Sedangkan, pasien MDR-TB yang terobati hanya 1.287 kasus pada tahun 2014 dan 1.566 kasus pada tahun 2015 (KemenKes RI, 2016). Oleh karena itu, pengembangan obat antituberkulosis (OAT) sangat diperlukan untuk mengatasi MDR-TB. Salah satu metode pengembangan obat yaitu dengan cara *docking molecular*.

Docking molecular merupakan suatu metode untuk mengetahui interaksi antara ligan dan reseptor secara molekuler menggunakan perangkat lunak. Protein target pada penelitian ini yaitu Enoyl-ACP Reductase (InhA) sub unit 2x22 dan 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (FabH) sub unit 1u6s. Kedua protein tersebut berperan dalam proses sintesis asam lemak pembentuk dinding sel. Fatty acid synthesis (FAS) merupakan proses biosintesis vital pada pembentukan fisiologi sel. FAS ada 2 tipe yaitu FAS I dan FAS II. FAS I ditemukan pada mamalia dan eukariot membentuk asam lemak dan polipeptida. FAS II ditemui pada bakteri, tanaman dan parasit (White et al, 2005). Enoyl-ACP Reductase (InhA) dan 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (FabH) merupakan enzim yang penting pada biosintesis asam lemak tipe II. FabH berperan sebagai inisiator pada proses elongation (White et al, 2005), sedangkan InhA merupakan katalisator untuk reduksi long-chain trans-2-enoyl-ACP pada jalur biosintesis asam lemak tipe II (He et al, 2007). Identifikasi sistematis secara genomik memiliki potensi yang bagus pada pengembangan obat baru OAT yang bekerja spesifik pada *M.tuberculosis*. Tujuan pada studi ini yaitu untuk memperoleh senyawa obat baru dari turunan biji dan kulit buah jeruk keprok dengan pendekatan secara komputasi.

2. METODE

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan berupa seperangkat komputer dengan software pengolah data PyRx 0.9.7, Chimera 1.12, Microsoft Office Excel 2007, Edit Plus 4.0.631, dan PDBest. Molekul senyawa yang diujikan yaitu senyawa turunan adas bintang, biji dan kulit buah jeruk keprok (Ru et al., 2014). Protein target *M.tuberculosis* yaitu Enoyl-ACP Reductase (InhA) sub unit 2x22 dengan ligan unik TCU dan 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (FabH) sub unit 1u6s dengan ligan unik DCC (Berman et al., 2000).

2.2. Preparasi Protein Dan Ligan

Searching protein target *M.tuberculosis* di website www.pdb.org dengan kriteria x-ray resolution kurang dari 2,5 Å dan memiliki ligan unik. Data protein target didownload dengan format SDF dan PDB. Jika data tersebut memiliki ANISOU maka difilter terlebih dahulu dengan PDBest. Masing-masing protein target dipreparasi dengan Chimera 1.12. (Pettersen et al., 2004) untuk memisahkan ligan natif dan proteinnya serta mengabaikan molekul air. Protein dan ligan dipreparasi untuk menghasilkan berkas siap pakai pada PyRx.

2.3. Validasi Metode

Validasi dilakukan dengan cara *molecular docking* ligan native dengan protein target. Konformasi hasil docking disejajarkan dengan ligan native sehingga diperoleh nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Nilai RMSD yang dapat diterima yaitu kurang dari 5, nilai RMSD yang semakin mendekati 0 dapat diartikan kesejajaran atau kemiripan semakin baik.

2.4. Molecular Docking

Molecular docking target molekul dengan target protein dilakukan dengan software PyRx (Dallakyan et al., 2015). Sebelum melakukan *molecular docking* terlebih dahulu diatur pusat masa ligan untuk masing-masing protein. *Molecular docking* dilakukan dengan metode

Vina Autodock (Trott, 2010). Output Vina Autodock diperoleh interaksi protein dengan ligan. Interaksi yang dimaksud berupa nilai *binding affinity* dengan satuan Kkal/mol. Nilai afinitas ikatan yang semakin mendekati nilai -12 Kkal/mol dapat diartikan ikatan dipastikan terjadi. Hasil *molecular docking* diambil 2 nilai terbaik untuk masing-masing ligan uji adas bintang, kulit buah dan biji buah jeruk keprok. Data interaksi antara ligan dan protein diperoleh dari PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC) dan PLIP (Salentin *et al.*, 2015) untuk melihat residu asam amino yang terlibat.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pencarian protein target dari database www.pdb.org pada organisme *M.tuberculosis* diperoleh Enoyl-ACP Reductase (InhA) sub unit 2x22 dan 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (FabH) sub unit 1u6s (Berman *et al.*, 2000). Enoyl-ACP Reductase (InhA) dan 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (FabH) merupakan enzim yang penting pada biosintesis asam lemak tipe II. FabH berperan sebagai inisiator pada proses elongation (White *et al.*, 2005), sedangkan InhA merupakan katalisator untuk reduksi long-chain trans-2-enoyl-ACP pada jalur biosintesis asam lemak tipe II (He *et al.*, 2007). *Molecular docking* dilakukan antara protein target dengan ligan native, adas bintang, kulit buah jeruk keprok dan biji buah jeruk purut (Ru *et al.*, 2014). Hasil *molecular docking* dipaparkan pada Tabel 1.

Hasil *docking* menunjukkan bahwa senyawa dalam kulit buah jeruk keprok dan adas bintang memiliki afinitas ikatan yang lebih rendah dari ligan native. Afinitas ikatan kaemferol terhadap protein 1u6s lebih rendah dibandingkan ligan nativenya yaitu L1. Senyawa mairin memiliki afinitas ikatan dengan protein 2x22, afinitas ikatannya lebih rendah dibandingkan ligan native L2. Kulit buah jeruk mengandung senyawa neohesperidin. Afinitas ikatan neohesperidin terhadap protein 2x22 lebih rendah dari ligan native L2. Perbedaan afinitas ikatan yang cukup signifikan diperoleh pada senyawa mairin terhadap protein 2x22.

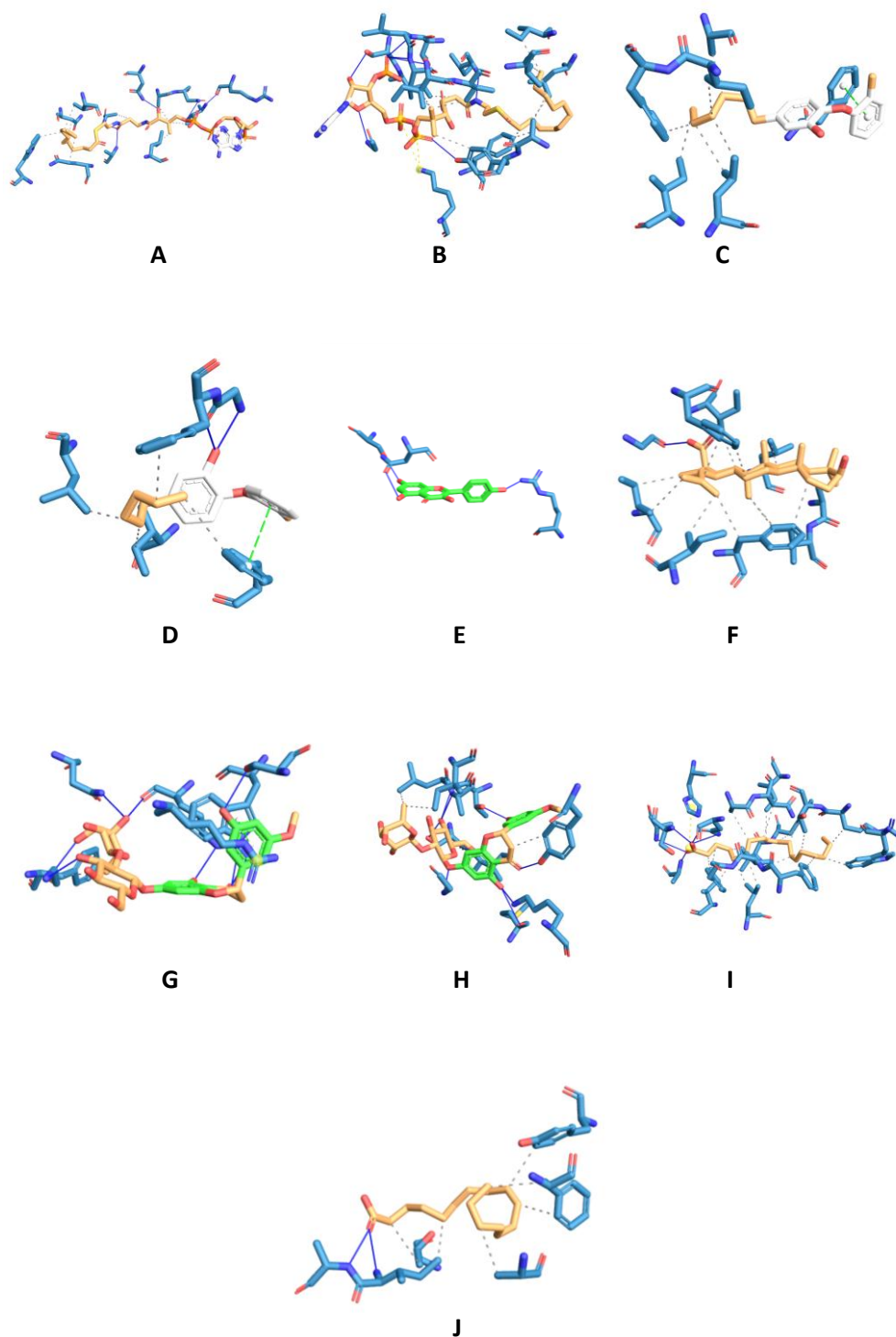
Tabel 1. Nilai binding affinity berdasarkan kelompok ligan

Ligand Category	Protein target	Ligand Code	Binding Affinity (Kkal/mol)
Ligan native	1u6s	L1	-8,2
Ligan native	2x22	L1	-9,4
Ligan native	1u6s	L2	-8,3
Ligan native	2x22	L2	-8,2
adas bintang	1u6s	Kaempherol	-8,8
adas bintang	2x22	Mairin	-10,1
kulit buah jeruk keprok	1u6s	Mol001797	-8
kulit buah jeruk keprok	2x22	Neohesperidin	-9,9
biji buah keprok	1u6s	EIC	-6,9
biji buah keprok	2x22	Zoomaric acid	-6,8

Tabel 2. Residu-residu protein target yang berinteraksi dengan ligan uji

Protein target	Ligan	Jenis Interaksi	Residu yang terlibat
1u6s	L1	-	-
2x22	L1	-	-
1u6s	L2	-	-
2x22	L2	-	-
1u6s	Kaempferol	Ikatan hidrogen	ASN, SER
2x22	Mairin	Hidrofobik	ILE, PHE, LEU, ALA
1u6s	Mol001797	Ikatan hidrogen	GLY
		Hidrofobik	PHE
		Ikatan hidrogen	SER, TRP, ARG, GLY, ASN
		pi-Stacking	TRP
2x22	Neohesperidin	pi-Cation	ARG
		Hidrofobik	TYR, LEU, ILE
		Ikatan hidrogen	SER, ILE, GLY, MET, TYR, LYS, THR, LEU, ALA
1u6s	EIC	Hidrofobik	TRP, ARG, THR, PHE, ILE, LEU, VAL, ALA, ASN
2x22	Zoomaric acid	Ikatan hidrogen	ALA, ASN, SER
		Jembatan garam	HIS
		Hidrofobik	ILE, PHE, TYR, ALA, THR
		Ikatan hidrogen	ILE, ALA

Nilai afinitas ikatan yang semakin rendah menunjukkan bahwa ligan tersebut mempunyai ikatan yang lebih kuat terhadap reseptor. Ikatan tersebut dapat dilihat dari hasil PLIP. Ikatan antara ligan dan protein diamati hasil interaksinya terhadap residu asam amino tertentu. Hasil PLIP ditunjukkan pada Tabel 2. Residu asam amino yang berinteraksi dengan mairin yaitu ILE, PHE, LEU, dan ALA pada jenis ikatan interkasi hidrofobik, sedangkan pada ikatan hidrogen residu asam amino yang terlibat yaitu GLY. Ikatan antara kaempferol dengan protein 1u6s yaitu merupakan jenis ikatan hidrogen dengan residu GLY. Neohesperidin memiliki ikatan hidrofobik terhadap protein 2x22 dengan residu yang terlibat yaitu TYR, LEU, dan ILE. Sedangkan pada jenis ikatan hidrogen, residu yang terlibat yaitu SER, ILE, GLY, MET, TYR, LYS, THR, LEU, dan ALA. Visualisasi ikatan protein dengan ligan diperoleh dari perangkat lunak PyMOL. Hasil visualisasi oleh PyMOL ditunjukkan pada Gambar 1. Hasil validasi metode diperoleh RMSD kurang dari 5 (data tidak ditampilkan).



Gambar 1. Konformasi hasil *molecular docking* ligan native L1-1u6s (A), ligan native L1-2x22 (B), ligan native L2-1u6s (C), ligan native L2-2x22 (D), kaempferol-1u6s (E), mairin-2x22 (F), mol001797-1u6s (G), neohesperidin-2x22 (H), EIC-1u6s (I), Zoomaric acid-2x22 (J)

4. KESIMPULAN

Hasil *molecular docking* menunjukkan nilai afinitas ikatan yang lebih rendah dari ligan native L1 pada protein target Iu6s yaitu kaempferol dengan *binding affinity* sebesar -8,8 Kkal/mol. Mairin dan neohesperidin memiliki nilai *binding affinity* lebih rendah dari ligan native L2 pada protein 2x22 dengan nilai *binding affinity* masing-masing -10,1 Kkal/mol dan -9,9 Kkal/mol. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa mairin memiliki afinitas ikatan terendah, hal tersebut dapat diartikan bahwa mairin merupakan senyawa yang memiliki interaksi paling tinggi dengan protein target 2x22.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya hantarkan kepada Bapak Broto Santoso selaku dosen Rancangan Obat yang membimbing saya selama proses pembelajaran maupun pembuatan artikel ilmiah, serta seluruh rekan peminatan sains Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta yang turut memberikan semangat dalam mengerjakan artikel ini.

REFERENSI

- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, and Bourne PE. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 28: 235-242.
- Dallakyan S, and Olson AJ. (2015). Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol Biol*. 1263:243-50.
- Dipiro J. T. et al., (2008). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. McGraw-Hill Medical.
- He, Xin. et al. (2007). Inhibition of the Mycobacterium tuberculosis enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. *Bioorg Med Chem*. 15(21): 6649–6658.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25(13): 1605-12.
- Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI. (2016). *Tuberkulosis: Temukan Obati Sampai Sembuh*. 1-12.
- Ru, J., Li, P., Wang J., Zhou, W., Li, B., Huang, C., Li, P., Guo, Z., Tao, W., Yang, Y., Xu, X., Li, Y., Wang, Y., and Yang L. (2014). TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *J Cheminformatics*. 6(1):13. DOI: 10.1186/1758-2946-6-13
- Trott O. (2010). The Molecular Graphics Lab at The Scripps Research Institute – AutoDock Vina is an open-source program for doing molecular docking. [cited 2017]. Dapat diakses pada laman: <http://vina.scripps.edu/index.html>
- Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, and Schroeder M. PLIP. (2015). fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res*. 43 (W1): W443-W447. DOI: 10.1093/nar/gkv315.
- White, Stephen W. (2005). THE STRUCTURAL BIOLOGY OF TYPE II FATTY ACID BIOSYNTHESIS. *Annu. Rev. Biochem*. 74:791–831.