

Kajian *in silico* Senyawa yang terkandung dalam Jeruk Pahit dan Adas Bintang terhadap Ribosa-5-Fosfat Isomerase B *Mycobacterium tuberculosis* (2VVO, 2VVP) menggunakan PyRx Vina-Autodock

Ghiyats Ramadhan^{1*}, Broto Santoso^{1*}

¹Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: ghiyats1202@gmail.com

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

Abstrak

Keywords:

Jeruk Pahit; Adas Bintang; ribosa-5-fosfat isomerase B; PyRx, anti-tuberkulosis

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri penyebab penyakit tuberkulosis yang sampai sekarang masih menjadi permasalahan penyakit utama di Indonesia dengan potensi tuberkulosis multi-drug resistant (TB MDR) yang meningkat. Kajian *in silico* dilakukan terhadap target tuberkulosis jalur ribosa-5-phospaye isomerase B dengan varian protein 2VVO dan 2VVP. Senyawa aktif yang dipakai pada kajian *in silico* ini adalah dari turunan jeruk pahit (*Citrus aurantium*). Protein dipisahkan dari residu dan diambil unique-ligand dari protein tersebut menggunakan Chimera. Perolehan binding affinity sebagai kuantifikasi interaksi antara protein-ligan dilakukan dengan PyRx metode Vina Autodock. Visualisasi interaksi ligan-protein dihasilkan dengan Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) dan PyMol. Hasil docking menunjukkan bahwa 4 ligand native 1 dan 2 (2VVO & 2VVP) memiliki nilai binding affinity sebesar -5,1 sampai -5,9 kkal/mol. Dua senyawa terbaik adas bintang yakni asam salisilat memiliki binding affinity -4,7 kkal/mol yang tidak lebih baik dibandingkan ligand native, sementara lainnya yaitu heriguard memiliki nilai binding affinity -5,6 kkal/mol, hal ini lebih baik dari dua ligand native dan tidak lebih baik dari dua ligand native lainnya, adas bintang memiliki kesamaan interaksi residu dengan ligand native berupa HIS 12, GLY 70, GLY 72, SER 71, ASN 73, GLU 75, dan ARG 113. Sementara, untuk senyawa terbaik jeruk pahit (hesperidin dan limonin) memiliki binding affinity lebih baik dari semua ligand native dengan nilai masing-masing -6,9 kkal/mol dan -7 kkal/mol dengan kesamaan interaksi residu HIS 12, GLY 70, SER 71, GLY 72, GLY 74, GLU 75, ARG 113. Nilai binding affinity yang paling kecil (dalam hal ini jeruk pahit) menunjukkan bahwasanya energi dari senyawa aktif untuk mengikat protein lebih kecil sehingga diharapkan dapat lebih efektif sebagai anti tuberkulosis.

Mycobacterium tuberculosis is a tuberculosis-causing bacteria that is still a major disease problem in Indonesia with the potential for increased multi-drug resistant tuberculosis (MDR TB). The silico study was conducted on the target of ribose-5-phospaye isomerase B pathogen tuberculosis with variant of 2VVO and 2VVP proteins. The active compounds used in this silico study are from bitter orange derivatives (*Citrus aurantium*). The protein is separated from the residue and taken unique-ligand from the protein using Chimera. The acquisition of affinity bindings as quantification of interactions between protein-ligand is done with PyRx method of Vina Autodock. Visualization of ligand-protein interactions is generated with Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) and PyMol. The docking results

show that 4 ligand native 1 and 2 (2VVO & 2VVP) have an affinity binding value of -5.1 to -5.9 kcal/mol. The two best compounds of starring fennel salicylic acid have affinity binds of -4.7 kcal/mol which are no better than native ligand, while others whose heriguard has an affinity binding value of -5.6 kcal/mol, this is better than two ligand natives and no better than the other two native ligands, starfish has the same residual interaction with the native ligand as HIS 12, GLY 70, GLY 72, SER 71, ASN 73, GLU 75, and ARG 113. Meanwhile, for the best bitter orange compound (hesperidin and limonin) have better affinity bindings than all native ligands with values of -6.9 kcal/mol and -7 kcal/mol with the similarity of HIS residual interactions 12, GLY 70, SER 71, GLY 72, GLY 74, GLU 75, ARG 113. The smallest value of affinity bindings indicates that the energy of the active compound to bind the proteins is smaller so it is expected to be more effective as an anti-tuberculosis.

1. PENDAHULUAN

World Health Organization (WHO), dalam laporannya pada tahun 2013 menyatakan bahwa diperkirakan terdapat 8,6 juta kasus tuberkulosis (TB) pada tahun 2012 dimana 1,1 juta orang (13%) di antaranya adalah pasien TB dengan HIV positif. Tahun yang sama, di 2012, diperkirakan pula terdapat 450.000 orang yang menderita tuberkulosis *multi drug resistant* (TBMDR) dan 170.000 orang di antaranya meninggal dunia (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

Indonesia menjadi negara yang menduduki peringkat ke-4 dunia dalam kasus TB (680.000 kasus) pada tahun 2011, sedangkan untuk kasus TB MDR menduduki peringkat ke-9 dunia (6.100) kasus pada tahun 2011 (Fauzan *et al.*, 2014). Angka notifikasi kasus menggambarkan cakupan penemuan kasus TB. Secara umum angka notifikasi kasus BTA positif baru dan semua kasus dari tahun ke tahun di Indonesia mengalami peningkatan. Angka notifikasi kasus (*case notification rate/CNR*) pada tahun 2015 untuk semua kasus sebesar 117 per 100.000 penduduk (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2016).

Tuberkulosis sendiri merupakan penyakit menular langsung yang disebabkan oleh kuman TB yakni *Mycobacterium tuberculosis*. Hampir 98% dari kasus TB, organ paru menjadi *port d'entree* dari kuman TB. Penularan TB biasa terjadi pada pasien TB BTA positif saat batuk atau bersin. Ketika pasien menyebarkan kuman ke udara dalam bentuk percikan dahak (*droplet nuclei*), sekali batuk dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan dahak. Faktor yang memungkinkan seseorang terpajan kuman TB ditentukan oleh konsentrasi percikan dalam udara dan lamanya menghirup udara tersebut (Wedhani, 2005).

Anisi stellati atau disebut sebagai tanaman adas bintang merupakan tanaman dengan minyak esensial (2,5-8%) dengan komponen utama berupa *trans*-anethole sebesar 80-90%. Dalam kandungan minyak esensial tersebut juga mengandung metilkavikol, p-metoksifenilaseton, anisaldehyd, fenchone, dan monoterpen yang berguna untuk penggunaan sakit perut dan ekspektoran (EMEA, 2000).

Sementara, *Citrus aurantium* (Rutaceae) dikenal juga sebagai "jerukpahit" di mana ekstrak buahnya dipasarkan dan digunakan secara tradisional sebagai produk penurunan berat badan herbal dan sebagai penekan nafsu makan. Pengoabatan tradisional China atau yang biasa disebut TCM kerap kali meresepkan bersamaan dengan ramuan pendukung lainnya. Alkaloid *p-synephrine* diyakini merupakan komponen aktif dari *Citrus aurantium* (Pelxoto *et al.*, 2012). Namun, kulit buahnya juga mengandung terpen, furokumarin dan flavonoid, termasuk hesperidin, neohesperidin, naringin dan tangeretin.

Kandungan *p-synephrine* dari ekstrak buah kering telah dilaporkan antara 3% sampai 6% (Haaz *et al.*, 2006).

Penelitian sebelumnya, (Sandoval-montemayor *et al.*, 2012) meneliti bahwa dalam satu genus yang sama dengan *Citrus aurantium*, yakni *Citrus aurantifolia* atau biasa dikenal dengan jeruk nipis mempunyai aktivitas antimikobakterial dengan hasil positif di mana hasilnya sebagai berikut: komponen 5,8-dimethoxypsoralen (5, MICs = 25-50 µg / mL), 5-geranyloxypsoralen (1, MICs = 50-100 µg / mL), asam palmitat (MICs = 25-50 µg / mL) asam linoleat (MICs = 50-100 µg / mL), asam oleat (MICs = 100 µg / mL), 4-hexen-3-one (MICs = 50-100 µg / mL), dancitral (MICs = 50 µg / mL). Sementara, di ketahui pula bahwasanya komponen mayor dalam *Citrus aurantifolia* terdiri dari 5-geranyloxypsoralen; 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin; 5,7-domethoxycoumarin; 5-methoxypsoralen; dan 5,8-dimethoxypsoralen yang hampir rata-rata termasuk dalam golongan kumarin, serta ditambah dengan beberapa komponen terpen memiliki kemiripan dengan senyawa-senyawa yang dimiliki oleh *Citrus aurantium* seperti linalyl 2-aminobenzoate; α -terpineol, β -linalool dan geraniol dideduksi mempunyai aktivitas antimikobakterial yang sama.

Citrus aurantium, dalam penelitian (Ouedrhiri *et al.*, 2015) telah menunjukkan hasil yang positif sebagai antimikroba dalam inhibisi bakteri *S. aureus*, *B. subtilis*, dan *E. coli*. Untuk membuktikan apakah terdapat aktivitas antara *Citrus aurantium* dengan protein 2VVO dan 2VVP sebagai protein *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan pekerjaan *molecular docking*/studi *in silico* untuk melihat apakah terdapat hubungan antara ligan dengan protein target. *Binding affinity* terbaik ditunjukkan dengan nilai yang paling kecil, artinya energi yang dibutuhkan untuk berikatan dengan protein target 2VVO dan 2VVP lebih kecil sehingga lebih efektif terhadap anti TBC. Berdasarkan hasil tersebut, diharapkan jeruk pahit (*Citrus aurantium*) memiliki potensi sebagai obat anti TBC yang dapat dikembangkan dalam masa mendatang.

2. METODE

2.1. Alat

Perangkat komputer Acer® Windows 10 Pro 64-bit Processor Intel®Core™ i3-6100T @3,20GHz RAM 4GB. PyRx 0.9.7. Chimera 1.12. Microsoft Office Excel 2007. Edit Plus 4.0.631. PDBest.

2.2. Bahan

Struktur kimia yang diuji yaitu dari turunan Jeruk Pahit (*Citrus aurantium*). Protein target yakni 2VVO dengan *unique ligand* A6P; 2VVP dengan *unique ligand* R52.

2.3. Langkah Pengerjaan

Pencarian protein pada *rcsb.org* didapatkan target protein 2VVO beresolusi 1,85 Å dan 2VVP beresolusi 1,65 Å untuk organisme *Mycobacterium tuberculosis* dengan target ribose-5-phosphate isomerase b. Kemudian protein dilihat terlebih dahulu menggunakan EditPlus apakah terdapat ANISOU atau tidak, jika terdapat ANISOU, maka protein dihilangkan terlebih dahulu ANISOU-nya menggunakan PDBest.

Protein 2VVO dan 2VVP kemudian dipreparasi menggunakan Chimera 1.12. untuk menghilangkan residu, baik menyisakan asam aminonya saja ataupun ligan saja. PyRx merupakan perangkat lunak untuk simulasi *docking molecular*. Dalam *docking*, pengaturan COM (*Center of Mass*) atau pusat massa ligan sangatlah penting untuk mengatur *binding site pocket* dari protein dan target ligan. Protein 2VVO, COM diatur koordinat x, y, dan z menjadi 34,33963; 10,80556, -10,1574 dengan dimensi *gridbox* 20; 20; 20. Protein selanjutnya, 2VVP diatur koordinat x, y, dan z menjadi 26,80627; -8,1908; 15,2632. Dengan dimensi *gridbox* 20; 15; 20.

Docking dilakukan dengan metode Vina Autodock untuk melihat bagaimana interaksi antara protein dan ligan. Data hasil atau *output* yang dihasilkan kemudian divisualisasikan

dengan PLIP dan PyMol untuk mengetahui residu-residu yang berinteraksi antara ligan-protein. Data hasil berupa *binding affinity* dan interaksi residu kemudian dianalisis.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas *molecular docking* dilakukan guna mengetahui interaksi ligan-protein antara turunan adas bintang (*Anisi stellati*) dan jeruk pahit/*bitter orange* (*Citrus aurantium*) dengan target 2VVO dan 2VVP sehingga tanaman adas bintang maupun jeruk pahit dapat berperan sebagai tanaman agen antituberkulosis. Hasil dari aktivitas *docking* sangat dipengaruhi oleh nilai *binding energy/binding affinity*. Semakin besar nilai *binding energy*, maka afinitas reseptor dengan ligan akan semakin rendah. Namun sebaliknya, apabila *binding energy* yang didapat dari hasil *docking* semakin rendah, maka semakin besar pula afinitas reseptor dengan ligan (Kastritis and Bonvin, 2013). Hal ini akan mencerminkan bahwa semakin kecil nilai *binding energy* maka semakin poten aktivitas dari ligan tanaman tersebut terhadap protein target.

Keseluruhan ligan uji berjumlah 112 senyawa jeruk pahit dan 98 senyawa adas bintang dengan protein target 2VVO dan 2VVP diperoleh dari *rcsb.org*. Protein target ini dipilih berdasarkan nilai resolusi yang kecil (kurang dari $<2,5\text{\AA}$), mempunyai *unique ligand* dan juga terdapat pada organisme *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1. Nilai *Binding Affinity* Hasil Aktivitas *Docking*

Tabel 1 menunjukkan nilai hasil aktivitas *docking molecular* melalui nilai *binding affinity*. Aktivitas *docking* dilakukan melalui metode Vina Autodock. Hasil ligan uji jeruk pahit menunjukkan bahwa kode ligan hesperidin mempunyai nilai *binding affinity* sebesar -6,9 kkal/mol, dan kode ligan limonin memiliki nilai *binding affinity* sebesar -7 kkal/mol. Hasil ini jauh lebih kecil dibandingkan *ligand native* baik pasangan 2VVO-2VVO, 2VVO-2VVP, 2VVP-2VVO, dan 2VVP-2VVP yang masing-masing memiliki besaran *binding affinity* -5,9 kkal/mol; -5,9 kkal/mol; -5 kkal/mol; -5,1 kkal/mol. Sementara, untuk adas bintang sendiri, kode ligan asam salisilat dan heriguard berturut-turut adalah -4,7 kkal/mol dan -5,6 kkal/mol. Hasil dari tabel tersebut memperlihatkan bahwa terdapat interaksi kuat antara grup ligan uji yakni *Citrus aurantium* dengan protein target baik 2VVO maupun 2VVP dibandingkan semua *ligand native*, namun berbanding terbalik dengan hasil yang didapatkan pada adas bintang dimana senyawa asam salisilat tidak lebih baik dari kesemua *ligand native*, dan heriguard hanya lebih baik 50% dari *ligand native*.

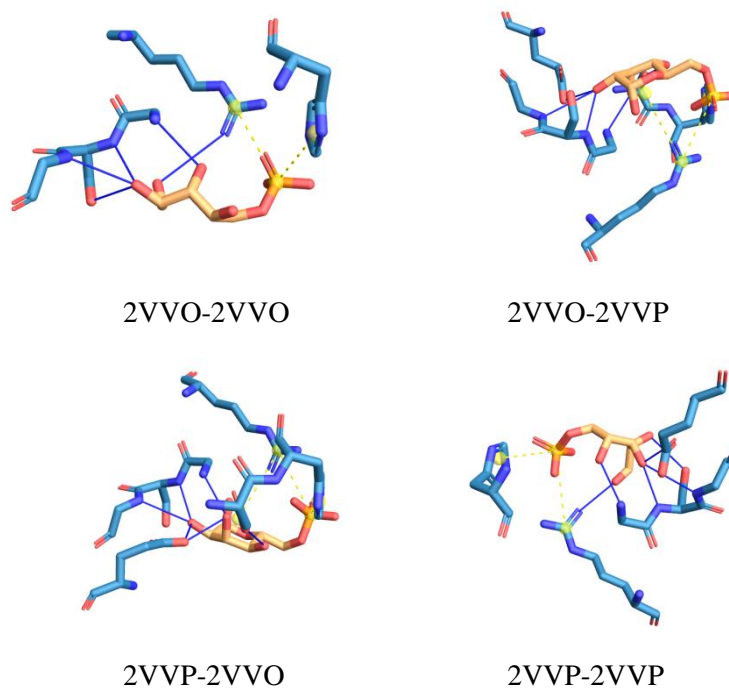
Skor afinitas ikatan hasil *docking* memperlihatkan bahwasanya terdapat potensi atau prospek dari *Citrus aurantium* terhadap target protein *Mycobacterium tuberculosis* yang kemudian perlu diteliti lebih lanjut di dalam skala laboratorium untuk membuktikan potensi tersebut. Sementara, turunan *Anisi stellati* yang mempunyai nilai *binding affinity* di bawah nilai *binding affinity* milik *ligand native* tidak dianggap memiliki potensi untuk dapat diteruskan ke dalam laboratorium, meskipun secara aktivitas *docking* heriguard memiliki aktivitas walau hanya 50%, tetapi juga patut untuk dapat diteruskan kepada skala laboratorium.

Tabel 1. *Binding affinity* hasil *ligand native* dan *Citrus aurantium* terhadap protein target.

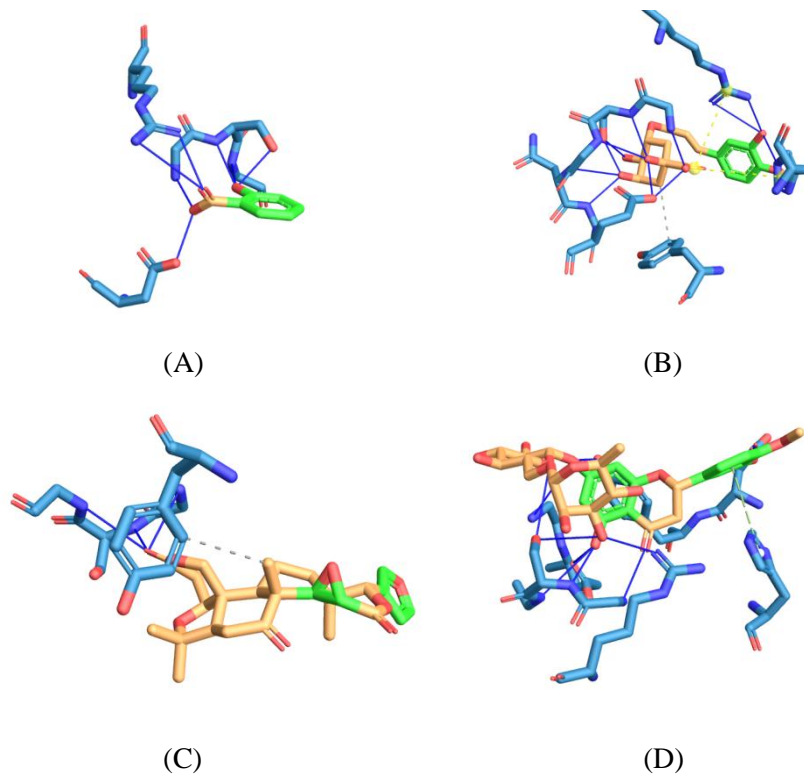
No	Senyawa	Protein Target	Kode Ligan	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)
1	Native 2VVO-ligan	2VVO	-	-5,9
2	Native 2VVO-ligan	2VVP	-	-5,9
3	Native 2VVP-ligan	2VVO	-	-5
4	Native 2VVP-ligan	2VVP	-	-5,1
5	Group <i>Anisi stellati</i>	2VVO	Asam salisilat	-4,7
6	Group <i>Anisi stellati</i>	2VVP	Heriguard	-5,6
7	Group <i>Citrus aurantium</i>	2VVO	Hesperidin	-6,9
8	Group <i>Citrus aurantium</i>	2VVP	Limonin	-7

3.2. Visualisasi Hasil Aktivitas *Docking*

Visualisasi dalam aktivitas *docking* diperlukan guna melihat interaksi residu-residu antara ligan dan protein. Selain itu, visualisasi yang menggunakan aplikasi PLIP ini berguna untuk melihat konformasi ligan-ligan yang berinteraksi pada *binding site pocket* dari protein 2VVO dan 2VVP (Gambar 1 dan Gambar 2).



Gambar 1. Konformasi 3D hasil visualisasi oleh PLIP *ligand native* terhadap protein 2VVO-2VVP.



Gambar 2. Konformasi 3D hasil visualisasi oleh PLIP sentawa adas bintang (*Anisi stellati*) dan jeruk pahit (*Citrus aurantium*) terhadap protein 2VVO-2VVP. (A) Visualisasi asam salisilat-2VVO; (B) Visualisasi heriguard-2VVP (C) Visualisasi hesperidin-2VVO; (D) Visualisasi limonin-2VVP.

Residu-residu protein yang berikatan dengan senyawa uji jeruk pahit sebagai ligan dan protein ditunjukkan dalam Tabel 2. Dapat dilihat bahwasanya residu-residu yang berinteraksi dengan protein target memiliki kemiripan dengan residu pada *ligand native*. Kemiripan interaksi residu ini semakin menguatkan dan mendukung bahwasanya *Citrus aurantium* dapat berfungsi sebagai agen antituberkulosis dengan kemiripan residu pada *ligand native*-nya. Namun, dalam ligan uji yang memiliki nilai *binding affinity* lebih kecil daripada *ligand native*-nya dapat dilihat bahwa residu-residu yang berinteraksi memiliki perbedaan dengan *ligand native* yakni diantaranya adanya ikatan hidrofobik dan *pi-stacking*. Kemungkinan dari fenomena ini adalah senyawa tersebut memiliki interaksi yang berbeda sehingga akan menimbulkan aktivitas biologis yang berbeda pula. Sementara pada *Anisi stellati*, residu-residu juga terlihat mirip namun kekuatan aktivitasnya lebih rendah dari residu *native*.

Tabel 2. Interaksi residu protein-ligan (PLIP)

No	Senyawa	Protein Target	Jenis Interaksi	Residu
1	Native 2VVO-ligan	2VVO	Ikatan Hidrogen	GLY 70, SER 71, SER 71, GLY 72, ARG 113
			Jembatan Garam	HIS 12, ARG 113
2	Native 2VVO-ligan	2VVP	Ikatan Hidrogen	ASP 11, ASP 11, GLY 70, SER 71, GLY 72, GLU 75
			Jembatan Garam	HIS 12, ARG 113, ARG 113
3	Native 2VVP-ligan	2VVO	Ikatan Hidrogen	ASP 11, GLY 70, SER 71, GLY 72, GLU 75, GLU 75
			Jembatan Garam	HIS 12, ARG 113, ARG 113
4	Native 2VVP-ligan	2VVP	Ikatan Hidrogen	GLY 70, SER 71, SER 71, GLY 72, GLU 75, ARG 113
			Jembatan Garam	HIS 12, ARG 113
5	Group <i>Anisi stellati</i> Asam salisilat	2VVO	Ikatan Hidrogen	ASP 11, GLY 70, SER 71, SER 71, GLY 72, ARG 113, ARG 113
6	Group <i>Anisi stellati</i> Heriguard	2VVP	Interaksi Hidrofobik	TYR 46
			Ikatan Hidrogen	HIS 12, HIS 12, GLY 70, SER 71, SER 71, SER 71, GLY 72, ASN 73, GLY 74, GLU 75, GLU 75, ARG 113, ARG 113
			Jembatan Garam	HIS 12, ARG 113
7	Group <i>Citrus aurantium</i> Hesperidin	2VVO	Interaksi Hidrofobik	TRY 46
			Ikatan Hidrogen	GLY 70, SER 71, GLY 72.
8	Group <i>Citrus aurantium</i> Limonin	2VVP	Ikatan Hidrogen	ASP 45, ASP 46, GLY 70, SER 71, SER 71, SER 71, GLY 72, GLY 74, GLU 75, ARG 113
			<i>Pi-stacking</i>	HIS 12

4. KESIMPULAN

Hasil aktivitas *docking molecular* turunan adas bintang (*Anisi stellati*) senyawa asam salisilat tidak lebih baik dari *ligand native* dan heriguard 50% lebih baik dari *ligand native* dengan *binding affinity* -5,6 kkal/mol, sementara aktivitas turunan jeruk pahit (*Citrus aurantium*) terhadap protein target 2VVO dan 2VVP dari organisme *Mycobacterium tuberculosis* memiliki potensi sebagai agen anti-tuberkulosis sebagai inhibitor dari jalur ribose-5-phosphate-isomerase B dengan nilai *binding affinity* pada senyawa hesperidin sebesar -6,9 kkal/mol, dan senyawa limonin senilai -7. Hasil ini lebih besar dibandingkan *ligand native*/standarnya, namun kajian secara *in silico* ini masih perlu penelitian lebih lanjut di laboratorium untuk membuktikan kebenaran hasil dari pemodelan *docking molecular*.

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*. 2000; 28: 235-242.
- EMEA, 2000, Committee for Veterinary Medicine Products: Anisi Stellati Fructus, *Veterinary Medicine and Information Technology Unit*, (January), 6–7.
- Fauzan A., Ahmadi U.F. and Susanna D., 2014, Analisis Spsial Penyakit Tuberkulosis Paru BTA Positif di Kota Sukabumi Tahun 2010-2012, *Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia*, 1–19.
- Haaz S., Fontaine K.R., Cutter G., Limdi N., Perumean-Chaney S. and Allison D.B., 2006, Citrus aurantium and Synephrine Alkaloids in the Treatment of Overweight and Obesity, *Obes*, 7, 79–88.
- Kastritis P.L. and Bonvin A.M.J.J., 2013, On the Binding Affinity of Macromolecular Interactions: Daring to Ask Why Proteins Interact, *Journal of The Royal Society*, 10 (20120835), 1–27.
- Kementerian Kesehatan RI, 2014, *Buku Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Ouedrhiri W., Bouhdid S., Balouiri M., Lalami A.E.O., Moja S., Chahdi F.O. and Greche H., 2015, Chemical Composition of Citrus aurantium L . Leaves and Zest Essential Oils, Their Antioxidant, Antibacterial Single and Combined Effects, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (1), 78–84.
- Pelxoto J.S., Comar J.F., Moreira C.T., Soares A.A., Oliveira A.L. de, Bracht A. and Peralta R.M., 2012, Effects of Citrus aurantium (Bitter Orange) Fruit Extracts and p-Synephrine on Metabolic Fluxes in the Rat Liver, *Molecules*, 17, 5854–5869.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25(13): 1605-12.
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2016, Tuberkulosis; Temukan Obati Sampai Sembuh, , 1–12.
- Sandoval-montemayor N.E., García A., Elizondo-treviño E., Garza-gonzález E., Alvarez L. and Camacho-corona M.R., 2012, Chemical Composition of Hexane Extract of Citrus aurantifolia and Anti-Mycobacterium tuberculosis Activity of Some of Its Constituents, *Molecules*, 5, 11173–11184.
- Wedhani R.A., 2005, *Patofisiologi, Diagnosis, dan Klasifikasi Tuberkulosis*, Departemen Ilmu Kedokteran Komunitas, Okupasi, dan Keluarga FK UI, Jakarta.