

## Uji Aktivitas Antituberkulosis Senyawa Alam Daun Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) dan Adas Bintang (*Anisi stellati*) terhadap reduktoisomerase 1-deoksi-D-ksilulosa-5-fosfat dengan Metode Komputasi *Docking* Molekuler

Afzalur Rahman<sup>1</sup>, Broto Santoso<sup>2</sup>

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

<sup>1</sup>Email: rohmanafzal@gmail.com

<sup>2</sup>Email: broto.santoso@ums.ac.id

### Abstrak

**Kata Kunci:**  
Tuberkulosis;  
jeruk keprok;  
adas bintang;  
docking  
molekuler;  
PyRx-vina;  
reduktoisomerase  
1-deoksi-D-  
ksilulosa 5-fosfat

Tahun 2016 terdapat 1,7 juta orang meninggal dari 10,4 juta orang yang terjangkit tuberkulosis. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa senyawa alam jeruk keprok memiliki aktivitas antimikroba pada beberapa bakteri gram positif dan gram negatif; sedangkan senyawa alam adas bintang dilaporkan tidak memiliki aktivitas antimikroba, akan tetapi dapat diharapkan minyak esensialnya mempunyai aktivitas antibakteri. Uji antituberkulosis dilakukan dengan membandingkan interaksi ligan-protein kedua senyawa alam tersebut dengan molekul poten yang telah ada menggunakan metode docking molekuler. Preparasi protein telah dilakukan menggunakan Chimera. Penambatan senyawa terpilih dilakukan terhadap molekul 3ZHY dan 3ZHJ yang memiliki aktivitas inhibisi terhadap reduktoisomerase 1-deoksi-D-ksilulosa-5-fosfat dari *Mycobacterium tuberculosis*. Profil interaksi ligan-protein dan visualisasinya dihasilkan dari PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) dan PyMOL. Hasil docking ligan native masing-masing protein diperoleh -7,7 dan -8,7 kkal/mol. Senyawa alam adas bintang Astragalin dan MOL008479 memiliki nilai binding affinity tertinggi pada protein 3ZHJ dan 3ZHY, yaitu -7,8 dan -8,1 kkal/mol. Sedangkan senyawa alam daun jeruk keprok MOL004746 memiliki nilai binding affinity tertinggi pada protein 3ZHY dan 3ZHJ, yaitu -4,9 dan -5 kkal/mol. Tidak dihasilkan senyawa alam yang dapat memberikan aktivitas inhibisi lebih baik dari ligan native. Senyawa alam dikatakan memiliki aktivitas lebih baik dari ligan native jika memiliki binding affinity lebih kecil dari ligan native.

### 1. PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah salah satu dari 10 penyebab kematian terbanyak di dunia. Pada tahun 2016 sebanyak 10,4 juta orang terjangkit TB; dan 1,7 juta orang meninggal karena penyakit ini (termasuk 0,4 juta di antaranya adalah orang dengan HIV). Lebih dari 95% kematian akibat TB terjadi di negara berpenghasilan rendah dan menengah. Tujuh negara penyumbang 64% dari total penderita adalah India sebagai penyumbang terbanyak penderita TB, diikuti oleh Indonesia, China, Filipina, Pakistan, Nigeria, dan Afrika Selatan. TB merupakan ancaman besar bagi kesehatan masyarakat dunia saat ini, terlebih dengan mulai muncul banyak kasus resistensi bakteri TB terhadap rifampisin selaku obat lini pertama yang efektif memerangi bakteri TB (WHO, 2017). Pengembangan pengobatan nampaknya diperlukan untuk menyelesaikan problematika dunia ini.

Pada pengatasan bakteri tuberkulosis terdapat beberapa celah yang bisa kita gunakan untuk mengatasi organisme ini. Salah satunya adalah pada jalur MEP (*intermediate 2-C-*

*methyl-Derythritol 4-phosphate*) bakteri TB. MEP merupakan jalur biosintesis *isopentenyl diphosphate* dan *dimethylallyl diphosphate*, yang mana senyawa tersebut merupakan senyawa penunjang kehidupan bakteri TB. Pengembangan penemuan obat dapat dilakukan dengan menemukan molekul yang dapat menghambat proses perubahan *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate* (DXP) menjadi MEP oleh enzim *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase* (DXR, atau juga bisa disebut IspC) (Jansson *et al.*, 2013). Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa molekul 3ZHY dan 3ZHZ dapat menghambat DXR dengan nilai  $IC_{50}$  0,32  $\mu$ M (Jansson *et al.*, 2013). 3ZHY dan 3ZHZ dapat kita gunakan sebagai patokan pencarian molekul baru yang lebih baik aktivitasnya. Pencarian molekul baru harus dilakukan secara efektif dan efisien.

Bioinformatika merupakan salah satu bidang yang dapat kita kembangkan untuk menemukan obat baru yang efektif dan efisien. Bioinformatika dapat kita andalkan karena proses ini bisa dilakukan lebih cepat sehingga lebih efisien baik dari segi waktu maupun finansial. *Molecular docking* merupakan metode komputasi untuk memprediksi ikatan nonkovalen makromolekul, molekul besar (reseptor), dan molekul kecil (ligan). Prosedur ini bertujuan memprediksi model ikatan dominan antara ligan dengan protein yang telah diketahui struktur tiga dimensinya. Prediksi ikatan molekul kecil dan protein tersebut sangat penting untuk menemukan senyawa penuntun yang selanjutnya digunakan untuk pengembangan obat. Penambatan molekul ini dapat digunakan untuk penampisan senyawa besar, pengurutan hasil, dan pembuatan hipotesis bagaimana sebuah ligan menghambat suatu reseptor (Apriaji & Elfaizi, 2004).

*Molecular docking* dilakukan berdasarkan prinsip bahwa reseptor membentuk kompleks dengan ligan. Ikatan ini terpengaruh oleh struktur enzim yang kaku dan fleksibel. Penambatan molekul akan mencari kandidat konformasi ikatan reseptor dengan ligan secara komputasional menggunakan algoritma pencarian. Perangkat lunak akan melakukan fungsi perhitungan mencari nilai energi bebas ikatan Gibbs, kecocokan energi (memprediksi afinitas ikatan), dan kandidat konformasi ikatan reseptor dengan ligan, kecocokan geometris (menemukan metode ikatan yang paling mungkin). Energi bebas ikatan sebanding dengan afinitas ligan dan ikatannya terhadap protein. Interaksi protein dan ligan akan terbentuk apabila kompleks yang dihasilkan memiliki energi bebas ikatan bernilai rendah. Semakin negatif energi ikatan bebas maka afinitas ligan terhadap proteinnya semakin kuat. Energi bebas ikatan yang rendah juga menunjukkan ikatan ligan dan reseptor yang stabil. Hasil analisis juga mendapatkan posisi dan ikatan ligan terhadap reseptor (DHNL, 2016).

Pada penelitian ini digunakan sampel senyawa alam daun jeruk keprok (*Citrus reticulata*) karena pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Javed *et al.*, 2014 spesies ini mempunyai aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri (Gram positif: *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium minutissimum*; Gram negatif: *Escherichia coli*, *Yersinia sp.*, dan *Klebsiella planticola*). Sedangkan senyawa alam adas bintang (*Anisi stellati*) yang sebelumnya dikabarkan tidak memiliki aktivitas antibakteri (EMEA, 2000), juga kami gunakan sebagai sampel dengan harapan dari senyawa alamnya dapat kita dapatkan senyawa yang dapat menghambat enzim *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase* lebih baik dari 3ZHY dan 3ZHZ.

## 2. METODE

### 2.1. Alat

Perangkat komputer, PyRx 0.9.7; PDBBest; Chimera 1.12; Microsoft Office Excel 2007; Edit Plus 4.0.631; PyMOL™ 1.7.x; PLIP.

### 2.2. Bahan

*Target from BindingDB for Mycobacterium tuberculosis*: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. Kode PDB protein beserta serta *Unique Ligand*-nya: 3ZHY, FM6 dan 3ZHZ, FM7 (Berman *et al.*, 2000). *Species of Plants*: Daun Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) dan Adas Bintang (*Anisi stellati*).

### 2.3. Langkah Pengerjaan

Pencarian target pada *rcsb.org* didapatkan target protein 3ZHY dan 3ZHZ untuk organisme *Mycobacterium tuberculosis* dengan target 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (Berman *et al.*, 2000). 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 2ZHY dan 2ZHZ kemudian dipreparasi menggunakan Chimera 1.12 (Pettersen *et al.*, 2004) untuk menghilangkan residu, baik menyisakan asam aminonya saja ataupun ligan saja. Lalu ditambahkan senyawa alam daun jeruk keprok dan adas bintang menggunakan OpenBabel (O'Boyle *et al.*, 2011), selanjutnya diteruskan pada proses Molecular Docking menggunakan AutoDock-Vina (Trott O, 2010) pada aplikasi PyRx (Dallakyan & Olson, 2015). Dalam *docking*, pengaturan COM (*Center of Mass*) atau pusat massa ligan sangatlah penting untuk mengatur *binding site pocket* dari protein dan target ligan. Protein 2ZHY, COM diatur koordinat  $x = 25,8494$ ;  $y = 9,6878$ ; dan  $z = 27,35464$  sesuai hasil; dengan dimensi *gridbox* 15; 15; 15. Protein selanjutnya, 2ZHZ diatur koordinat  $x = 20,28416$ ;  $y = 23,41642$ ; dan  $z = -16,4697$  sesuai hasil; dengan dimensi *gridbox* 15; 15; 15.

Hasil dari *docking* (berupa nilai binding affinity) dianalisis dan dipilih molekul dengan *binding affinity* terbaik untuk selanjutnya diteruskan pada proses visualisasi interaksi. Visualisasi dilakukan dengan menyisakan satu model ligan terbaik dari tiap molekul menggunakan EditPlus, digabungkan dan disimpan molekul ligan terbaik beserta proteinnnya menggunakan PyMOL (The PyMOL, LLC), kemudian *run plipf* hingga didapatkan file data dan gambar interaksi ligan (Salentin *et al.*, 2015).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil *molecular docking* turunan senyawa alam daun jeruk keprok (12 senyawa) dan adas bintang (49 senyawa), tidak didapatkan senyawa yang memiliki aktivitas inhibisi lebih baik dari 3ZHY dan 3ZHZ (Tabel 1, *grid score*). *Grid score* merupakan energy yang dibutuhkan oleh ligan untuk berikatan dengan *active site* (Santoso *et al.*, 2014a), semakin kecil nilainya maka akan semakin kecil energy yang dibutuhkan untuk berikatan dengan *active site*, dan ligan akan mudah berikatan dengan *active site* dan dapat secara spontan berikatan dengan *active site* (Santoso *et al.*, 2014b). Meskipun *grid score* dari ligan yang diuji tidak mempunyai hasil yang lebih baik dibandingkan dengan ligan *native*, penelitian ini dapat kita manfaatkan untuk mengetahui kesamaan mekanisme interaksi antara ligan yang diuji dengan ligan *native* dari protein target (Tabel 2). Hasil penelitian ini juga dapat dimanfaatkan untuk mengetahui residu yang paling banyak terlibat pada pengikatan ligan dengan *active site* (Tabel 2). Apabila dibandingkan dengan ligan nativ (asli), jenis asam amino yang digunakan senyawa alam dalam pengikatan *active site* sebagian besar berbeda dengan 3ZHY dan 3ZHZ (Tabel 2). Meskipun beberapa senyawa menyajikan residu yang sama, namun jumlahnya hanya sedikit.

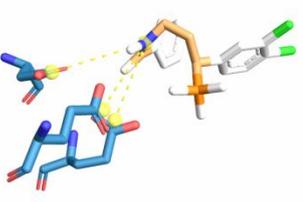
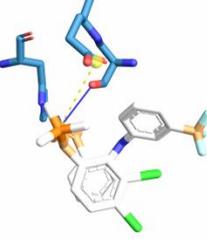
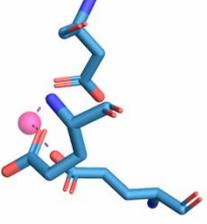
**Tabel 1. *Gird score/binding affinity* terbaik dari masing-masing kategori ligan**

Kategori Ligan	Protein Target	Kode Ligan	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)
3ZHY ( <i>native</i> )	3ZHY	FM6	-7,7
3ZHZ	3ZHY	FM7	-7,3
3ZHZ ( <i>native</i> )	3ZHZ	FM7	-8,7
3ZHY	3ZHZ	FM6	-7,3
Adas Bintang	3ZHY	mol008479	-8,1
Adas Bintang	3ZHZ	Astragalin_MOL000561	-7,8
Daun Jeruk Keprok	3ZHY	mol004746	-4,9
Daun Jeruk Keprok	3ZHZ	mol004746	-5

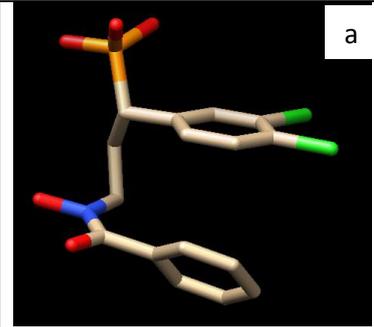
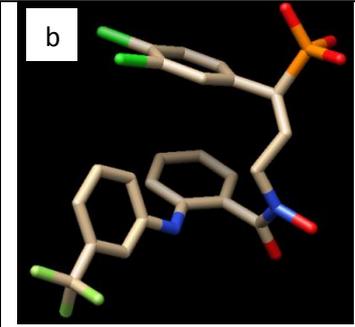
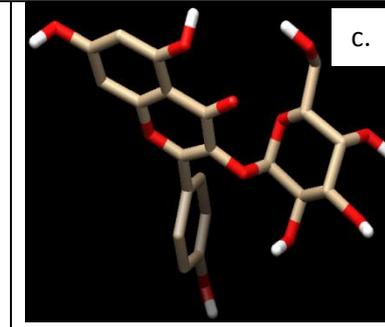
**Tabel 2. Interaksi ligan-protein beserta residu yang berperan**

Protein target	Ligand	Jenis Interaksi	Residu yang terlibat
3ZHY	FM6 ( <i>native</i> )	Jembatan garam	ASP 151, GLU153, GLU222
3ZHY	FM7	Ikatan hydrogen Ikatan halogen Kompleks logam Interaksi hidrofobik Jembatan garam	SER177 LYS128 ASP 151, GLU153, GLU222 ILE24 HIS50
3ZHZ	FM6	Ikatan hydrogen Jembatan garam	ASN218 GLU153, GLU222
3ZHZ	FM7 ( <i>native</i> )	Ikatan hydrogen Jembatan garam	SER152, HIS248 GLU153
3ZHY	mol008479	Kompleks logam Interaksi hidrofobik Ikatan hidrogen  Jembatan garam	ASP 151, GLU153, GLU222 ILE24 THR21, GLY22, SER23, ILE24, GLY47, GLY48, ALA49, HIS50, ASN127, LYS128, GLU129, SER204, GLY206, ASN209 HIS50
3ZHZ	Astragalin	Ikatan hydrogen	LYS128, SER177, ASN209, ASN218, SER245, ILE247
3ZHY	mol004746	Kompleks logam Interaksi hidrofobik Ikatan hydrogen  Jembatan garam	ASP 151, GLU153, GLU222 ILE24 THR21, GLY22, SER23, ILE24, GLY47, GLY48, ALA49, HIS50, ASN127, LYS128, GLU129, SER204, GLY206, ASN209 HIS50
3ZHZ	mol004746	Interaksi hidrofobik	ILE24, VAL150, ASP151, GLU153

**Tabel 3. Visualisasi interaksi ligan native FM6-3ZHY, FM7-3ZHZ, dan mol008479-3ZHY**

a. 	b. 	c. 
<b>Native FM6-prot3ZHY</b>	<b>Native FM7-prot3ZHZ</b>	<b>mol008479-prot3ZHY</b> (Senyawa alam uji terbaik)

Tabel 4. Visualisasi ligan

 <p>a</p>	 <p>b</p>	 <p>c.</p>
<p><b>Native FM6(3ZHY)</b> <i>Grid score: -7,7</i></p>	<p><b>Native FM7(3ZHZ)</b> <i>Grid score: -8,7</i></p>	<p><b>mol008479</b> <b>(Senyawa alam uji terbaik)</b> <i>Grid score: -8,1</i></p>

Untuk visualisasi 3D interaksi ligan hasil PLIP (*run plipf*) yang telah dituliskan (pada Tabel 2.) dapat dilihat pada Tabel 3. Sedangkan Tabel 4. memuat visualisasi 3D struktur ligan.

#### 4. KESIMPULAN

Hasil docking ligan native (FM6-3ZHY dan FM7-3ZHZ) masing-masing protein diperoleh *grid score* atau *binding affinity* -7,7 dan -8,7 kkal/mol. Senyawa alam adas bintang Astragalin dan MOL008479 memiliki nilai *binding affinity* tertinggi pada protein 3ZHZ dan 3ZHY, yaitu -7,8 dan -8,1 kkal/mol. Sedangkan senyawa alam daun jeruk keprok MOL004746 memiliki nilai *binding affinity* tertinggi pada protein 3ZHY dan 3ZHZ, yaitu -4,9 dan -5 kkal/mol. Tidak dihasilkan senyawa alam yang dapat memberikan aktivitas inhibisi pada DXR lebih baik dari ligan native. Senyawa alam dikatakan memiliki aktivitas lebih baik dari ligan native jika memiliki *binding affinity* lebih kecil dari ligan native.

#### REFERENSI

- Aprijani, D.A. & Elfaizi, M.A., 2004. Bioinformatika: Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia. Hak Cipta © 2004 oleh M. Abdushshomad Elfaizi dan Dwi Astuti Aprijani.
- Berman HM, *et al.*, 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28: 235-242.
- Dallakyan S, and Olson AJ. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol Biol*. 2015; 1263:243-50.
- EMEA, 2000. Committee For Veterinary Medicinal Product: *Anisi stellati* Fructus Summary Report. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product, Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA/MRL/710/99-FINAL. January 2000.

- DHNLr, 2016, Penambatan Molekul (Molecular Docking): Pengenalan, *Submitted by dhnlr on Wed, 16/11/2016 - 16.08*, Terdapat di: <https://dhnlr.com/teknop/penambatan-molekul-molecular-docking-pengenalan>, [Diakses pada 24 Desember 2017].
- Jansson, A.M., *et al.*, 2013. *DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogues*. Journal of Medicinal Chemistry. [dx.doi.org/10.1021/jm4006498](https://doi.org/10.1021/jm4006498) | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX.
- Javed, S., *et al.*, 2014. Phytochemistry, GC-MS Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Potential of Essential Oil From Five *Citrus* Species. Journal of Agricultural Science; Vol. 6, No. 3; 2014, ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760. Published by Canadian Center of Science and Education.
- O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, and Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. J. Cheminformatics. 2011; 3: 33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33.
- Pettersen E.F., *et al.*, 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004; 25(13): 1605-12.
- Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, and Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. Nucl. Acids Res. 2015; 43 (W1): W443-W447. DOI: 10.1093/nar/gkv315.
- Santoso<sup>a</sup>, B., Hanwar, D., Suhendi, A., Kusumowati, I.T.D., and Melannisa, R., 2014. Docking Molekular Terbalik dari Senyawa Zerumbon. Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami [SPBOA] XVI & Mukhtar XII PERHIPBA, 23-24 April 2014, 464-474.
- Santoso<sup>b</sup>, B., As Sabiq, M.R., Da'i, M., Hanwar, D., Suhendi, A., 2014. Penilaian Hasil *Molecular Docking* Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Ptp1b Menggunakan Dock6. *Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- Trott O. The Molecular Graphics Lab at The Scripps Research Institute – AutoDock Vina is an open-source program for doing molecular docking. 2010. [cited 2017]. Dapat diakses pada laman: <http://vina.scripps.edu/index.html>.
- World Health Organization, 2017, Tuberculosis, Fact sheet, Updated October 2017, Terdapat di: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>, [Diakses pada 24 Desember 2017].