

Skrining Molekular Senyawa Alam Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*) dan Adas Bintang (*Anisi stellati*) pada *Mycobacterium tuberculosis* Menggunakan PyRx-vina

Iin Chintika Irianti Dani Bintari¹, Broto Santoso²

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

¹Email: iinirianti5@gmail.com

²Email: broto.santoso@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:
Tuberkulosis;
Patikan kebo;
Adas Bintang;
Moleculardockin
g, PyRx-vina

Indonesia menjadi negara yang menduduki peringkat kedua sebagai negara menyumbang 56% kasus tuberkulosis dari jumlah total global pada tahun 2016. Molecular docking menjadi alternatif dalam penemuan senyawa poten pengganti isoniazid. Salah satu target aksi adalah protein enoyl-ACP reductase (InhA) M. tuberculosis dengan PDB-ID 5MTP dan 5MTR sehingga penelitian ini bertujuan untuk mencari senyawa alam poten sebagai anti tuberkulosis, pengganti isoniazid melalui penargetan protein InhA. Skrining senyawa alam yang berasal dari herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*) dan buah adas bintang (*Anisi stellate*) telah dilakukan menggunakan PyRx-vina. Hasil afinitas ikatan senyawa euphohelionone (herba patikan kebo) dan senyawa zinc02040907 (adas bintang) terhadap protein 5MTP dan ikatan senyawa lupeol (herba patikan kebo) dan senyawa kaempferol (adas bintang) terhadap 5MTR secara berturut-turut adalah -8,6; -8,2 dan 8,1; -7,8 kkal/mol. Aktivitas dari senyawa-senyawa tersebut menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan native ligand dengan proteinnya yaitu pada 53K pada protein 5MTP dan XT0 pada protein 5MTR sehingga didalam herba patikan kebo dan buah adas bintang tidak ditemukan senyawa poten sebagai pengganti isoniazid untuk pengobatan tuberkulosis.

1. PENDAHULUAN

Tuberkulosis atau yang dikenal TB merupakan penyakit infeksi paru-paru dan salah satu penyakit mematikan. Tuberkulosis disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Menurut WHO, pada tahun 2016 penyakit ini juga menjadi penyebab kematian kesembilan diseluruh dunia. Indonesia menjadi salah satu dari lima negara yaitu India, Indonesia, China, Filipina, dan Pakistan (dalam urutan) sebagai negara yang menyumbang 56% kasus TB dari jumlah total global. Jumlah kematian akibat TB di Indonesia sebesar 110 ribu atau setara dengan 42 kasus per 100 ribu populasi (WHO, 2017). Salah satu pengobatan TB yang digunakan adalah isoniazid, namun kini banyak pasien TB yang mengalami resistensi terhadap isoniazid (DiPiro *et al.*, 2008). Untuk mengurangi masalah resistensi pada isoniazid, maka dikembangkan penelitian yang menargetkan aksi pada dinding sel *mycobacterium*, khususnya pada biosintesis asam mikolik yang melibatkan beberapa siklus enzimatik secara berurutan dan terutama pada dua sistem Fatty Acid Synthase (FAS) yang saling berkaitan namun berbeda yaitu FAS I dan FAS II. InhA (enoyl-acyl carrier protein reductase) adalah bagian dari FAS II dan menunjukkan aktivitas yang tidak bergantung pada NNR-ACP reduktase. InhA adalah protein penting dari *Mycobacterium tuberculosis* sehingga InhA merupakan target yang krusial terdapat pada *mycobacterium* (Matviuk *et al.*, 2013). 5MTP dan 5MTR merupakan bagian dari protein InhA yang terdapat pada *Mycobacterium*

tuberculosis dan keduanya mempunyai *unique ligand* atau yang disebut dengan *native ligand* yang hanya bisa ditemui pada organisme *Mycobacterium tuberculosis* yaitu 53K pada 5MTP dan XT0 pada 5MTR sehingga diharapkan pengembangan penelitian berbasis *molecular docking* dapat mengatasi masalah resistensi terhadap isoniazid dengan cara menargetkan tempat aksi hanya pada *Mycobacterium tuberculosis*.

Molecular docking merupakan proses berbasis komputasi yang dapat memprediksi interaksi antara makromolekul (protein) dengan molekul kecil (ligan). Tujuan dari *molecular docking* yaitu mengetahui dan mencari senyawa yang diduga mempunyai aktivitas biologis yang besar sehingga dapat dikembangkan menjadi senyawa penuntun dalam perkembangan obat (Truhlar, 2009). Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, menunjukkan bahwa ekstrak methanol, n-heksana, dan etil asetat patikan kebo mempunyai aktivitas sebagai anti TB dengan penurunan persentase RLU (*relative light unit*) sebesar 48,92%; 44,51%; dan 64,73% pada konsentrasi 500 µg/mL, sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah isoniazid menunjukkan penurunan persentase RLU sebesar 99,76% pada konsentrasi 2 µg/mL. Diduga saponin, sterol, terpena, alkaloid, polifenol, tanin dan flavonoid pada patikan kebo berperan sebagai antimikobakteri (Rajasekar *et al.*, 2015). Adas bintang mengandung *trans*-anethole yang mempunyai aktivitas sebagai antimikrobakteri dan antifungi (Huang *et al.*, 2010; De, 2014). Menurut (Andrade-Ochoa *et al.*, 2015), *trans*-anethole mempunyai aktivitas sebagai antimikobakterial (*Mycobacterium tuberculosis*) sebesar $20,83 \pm 7,22$ µg/mL. Oleh karena itu, diharapkan dengan *molecular docking* dapat diketahui senyawa pada patikan kebo dan adas bintang yang mempunyai aktivitas antimikobakterial yang besar, khususnya pada *Mycobacterium tuberculosis*.

2. METODE

Dua jenis protein target pada InhA yang digunakan yaitu 5MTP dan 5MTR, dimana 5MTP mempunyai *unique ligand* 53K dan 5MTR mempunyai *unique ligand* XT0 yang diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org). Preparasi protein 5MTP dan 5MTR menggunakan perangkat lunak chimera (Pettersen *et al.*, 2004) yang sebelumnya protein tersebut telah dihilangkan ANISOU menggunakan perangkat lunak PDbest. Untuk melihat apakah protein mengandung ANISOU apa tidak dapat dilihat menggunakan perangkat lunak editplus. Preparasi protein menggunakan perangkat chimera bertujuan untuk menghilangkan residu seperti air dan memisahkan asam amino dengan ligan dari protein tersebut.

Perangkat lunak PyRx-Autodock-Vina (Trott, 2010) digunakan untuk simulasi *molecular docking*. Ligan yang digunakan adalah *native ligand* dari 5MTP yaitu 53K dan *native ligand* dari 5MTR yaitu XT0, sedangkan makromolekul yang digunakan yaitu senyawa dari patikan kebo dan protein dari 5MTP dan 5MTR. Pusat massa docking didapatkan dari pusat massa masing masing *native ligand* yang dapat dilihat pada table 1.

Docking dilakukan dengan metode Vina Autodock untuk melihat *binding affinity* antara protein dan ligan. Hasil docking molekular yang dipilih memiliki nilai *binding affinity* yang rendah dan memiliki kesamaan interaksi *native ligand* dengan residu asam amino. Visualisasi interaksi ligan/senyawa alam terhadap protein 5MTP dan 5MTR menggunakan program PyMol dan interaksi yang didapatkan kemudian di PLIP (Salentin *et al.*, 2015) secara *off line* agar didapatkan interaksi apa saja yang terjadi pada ligan/senyawa dengan protein.

Tabel 1. Pusat massa ligand dan dimensi *gridbox ligand*

| Ligan | Pusat massa (Å) | | | Dimensi <i>gridbox</i> (Å) | | |
|-------|-----------------|----------|----------|----------------------------|----|----|
| | X | Y | Z | X | Y | Z |
| 5MTP | 13,1733 | -5,76474 | 52,25826 | 100 | 70 | 36 |
| 5MTR | 28,91207 | 3,870159 | 38,7523 | 100 | 70 | 36 |

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil *binding affinity* pada *native ligand* 53K terhadap 5MTP dan *native ligand* XT0 terhadap 5MTR secara berturut-turut sebesar 12,1 kkal/mol dan 7,3 kkal/mol, sedangkan hasil *binding affinity* senyawa Zinc02040970 (Adas bintang) dan senyawa Euphohelionone (Patikan kebo) terhadap protein 5MTP dan hasil *binding affinity* senyawa Kaempferol (Adas bintang) dan senyawa Lupeol (Patikan kebo) terhadap 5MTR berturut-turut sebesar -8,1; -8,6; -7,8; dan -8,2 kkal/mol.

Berdasarkan hasil *molecular docking*, *binding affinity* senyawa Zinc02040970 (Adas bintang) dan senyawa Euphohelionone (patikan kebo) terhadap protein 5MTP lebih besar dibandingkan *binding affinity* 53K (*native ligand* dari 5MTP) terhadap protein 5MTP, namun lebih kecil dibandingkan dengan *binding affinity* XT0 (*native ligand* dari 5MTR) terhadap protein 5MTP. Untuk *binding affinity* terhadap protein 5MTR, menunjukkan bahwa senyawa Kaempferol (Adas bintang) dan senyawa Lupeol (Patikan kebo) memiliki *binding affinity* lebih besar dibandingkan *binding affinity* 53K (*native ligand* dari 5MTP) terhadap protein 5MTP, namun lebih kecil dibandingkan dengan *binding affinity* XT0 (*native ligand* dari 5MTR) terhadap protein 5MTR. Hasil *binding affinity native ligand*/senyawa terhadap protein dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil *binding affinity native ligand*/senyawa terhadap protein

| Ligan | Protein target | Binding affinity (kkal/mol) | Nama Native ligand/Senyawa |
|--------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|
| 5MTP | 5MTP | -12,1 | 53K |
| 5MTR | 5MTP | -7,5 | XT0 |
| 5MTP | 5MTR | -12,2 | 53K |
| 5MTR | 5MTR | -7,3 | XT0 |
| Adas bintang | 5MTP | -8,1 | zinc02040970 |
| Adas bintang | 5MTR | -7,8 | kaempferol |
| Patikan kebo | 5MTP | -8,6 | euphohelionone |
| Patikan kebo | 5MTR | -8,2 | lupeol |

Binding affinity menunjukkan kekuatan berikatan antara *native ligand* dengan protein. Hasil *binding affinity* pada proses *molecular docking* senyawa alam pada tumbuhan Adas Bintang dan Patikan Kebo terhadap proteinnya (5MTP dan 5MTR) diharapkan mendekati atau lebih kecil dibandingkan *binding affinity native ligand* terhadap proteinnya (5MTP dan 5MTR), sehingga senyawa alam pada Adas Bintang dan Patikan Kebo dapat menggantikan posisi *native ligand* 53K dan XT0 pada protein 5MTP dan 5MTR sebagai senyawa poten untuk anti TB. Pada senyawa alam yang terdapat pada Adas Bintang (Zinc 02040970 dan Kaempferol) dan Patikan Kebo (Euphohelionone dan Lupeol), senyawa alamnya hanya memiliki *binding affinity* yang lebih rendah terhadap protein 5MTP dan 5MTR jika senyawa alam tersebut menggantikan kedudukan *native ligand* dari 5MTR yaitu XT0, namun tidak pada *native ligand* 53K (*native ligand* dari 5MTP)

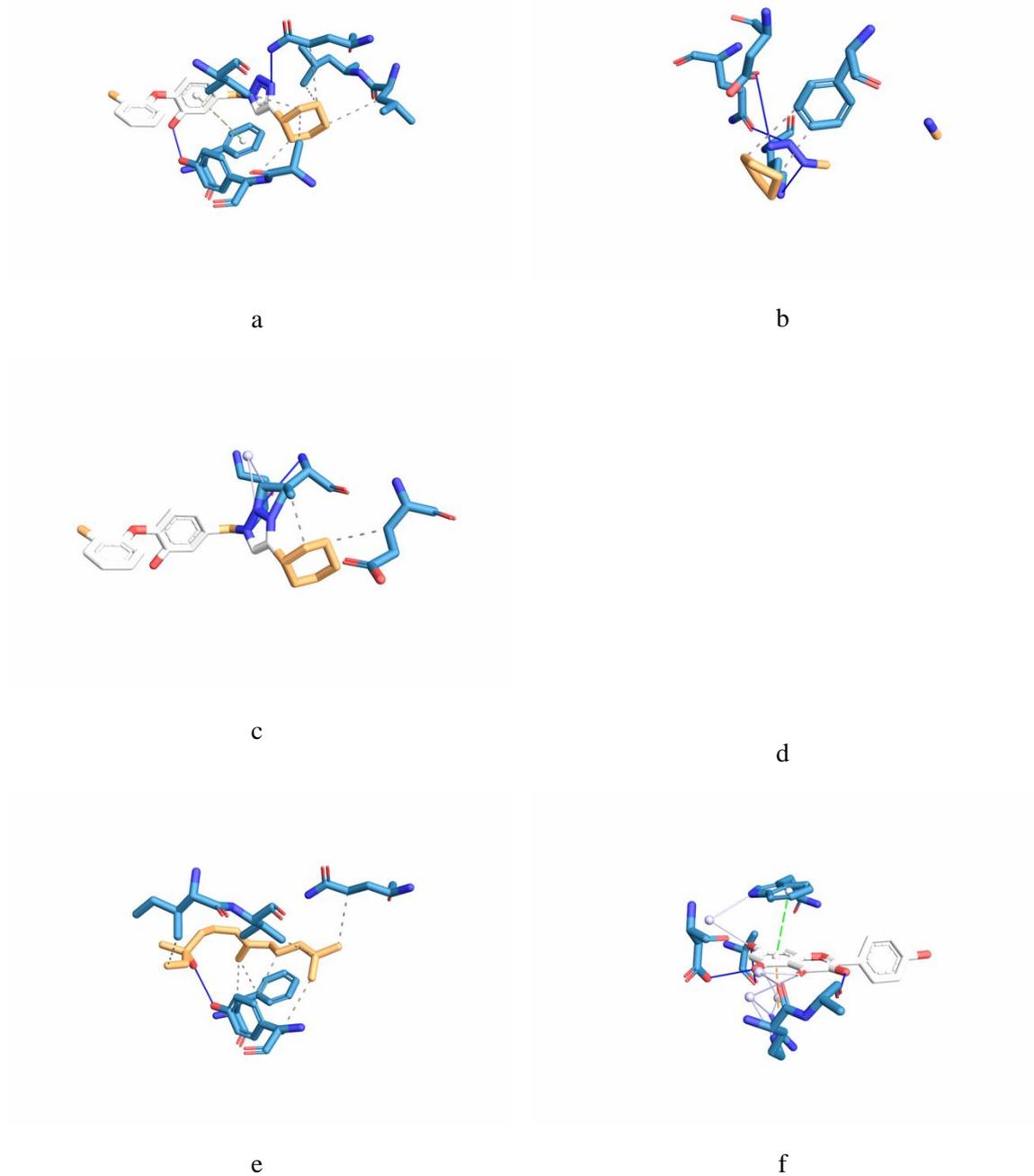
Senyawa alam pada Adas Bintang (Zinc 02040970 dan Kaempferol) dan Patikan Kebo (Euphohelionone dan Lupeol) dikatakan sebagai senyawa poten sebagai anti TB selain dilihat dari nilai *binding affinity*-nya juga harus dilihat dari interaksi senyawa alam tersebut dengan protein 5MTP dan 5MTR sama atau tidak dengan jenis interaksi dan residu asam amino yang terlibat pada *native ligand* dengan protein 5MTP dan 5MTR. Hasil Interaksi *native ligand*/senyawa pada adas bintang dan protein dapat dilihat pada tabel 2. Berdasarkan tabel 3, hanya senyawa Zinc 02040970 (Adas bintang) terhadap protein 5MTP yang mempunyai jenis interaksi yang sama dengan *native ligand*53K terhadap protein 5MTP yaitu interaksi hidrofobik pada residu asam amino 158 Try dan ikatan hidrogen pada residu asam amino 158 Try.

Visualisasi interaksi pada *native ligand*/senyawa pada Adas Bintang dan Patikan Kebo dengan protein 5MTP dan 5MTR dapat dilihat pada gambar 1 dan gambar 2. Visualisasi interaksi *native ligand*XT0 terhadap protei 5MTR dapat dapat dimunculkan karena tidak adanya interaksi pada XT0 dengan protein 5MTR.

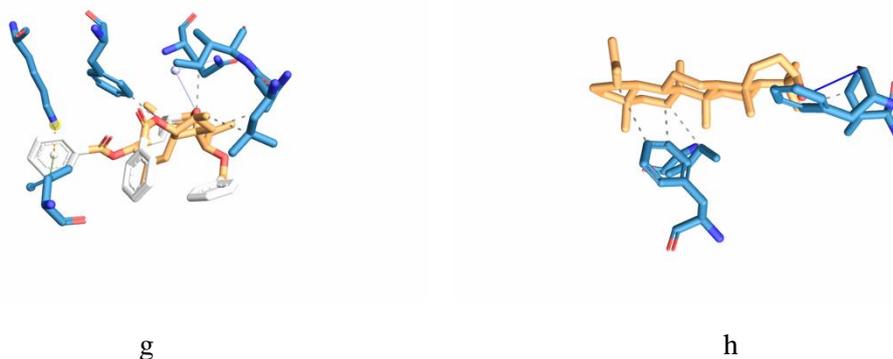
Tabel 3. Interaksi *native ligand*/senyawa pada adas bintang dan protein

| Native ligand | Protein target | Jenis Interaksi | Residu Asam Amino |
|----------------------------------|----------------|--|--|
| 53K | 5MTP | Interaksi hidrofobik | 157 Ala, 158 Tyr, 203 Val, 214 Gln, 217 Leu, dan 218 Leu |
| | | Ikatan hidrogen Pi-stacking | 158 Tyr dan 214 Gln 149 Phe |
| XT0 | 5MTP | Interaksi hidrofobik Ikatan hidrogen | 41 Phe 64 Asp, 66 Gln, dan 118 Lys |
| 53K | 5MTR | Interaksi hidrofobik Ikatan hidrogen Jembatan air | 215 Ile dan 219 Glu 215 Ile 212 Gly |
| XT0 | 5MTR | - | - |
| Zinc02040970 (adas Bintang) | 5MTP | Interaksi hidrofobik Ikatan Hidrogen | 149 Phe, 158 Tyr, 202 Ile, 203 Val dan 214 Gln 158 Tyr |
| Kaempferol (Adas Bintang) | 5MTR | Ikatan hidrogen Jembatan air Pi-stacking Interaksi pi-cation | 150 Asp, 154 Ala, dan 264 Ala 153 Arg dan 222 Trp 222 Trp 153 Arg |
| Euphohelionone (Patikan Kebo) | 5MTP | Interaksi Hidrofobik Jembatan Air Pi-Stacking Interaksi pi-cation | 97 Phe, 197 Leu, 201 ala, dan 202 Ile 100 Gln 41 Phe 118 Lys |
| Lupeol (Patikan Kebo) | 5MTR | Interaksi hidrofobik Ikatan hidrogen | 16 Ile, 97 Phe, dan 202 Ile 41 Phe |

*Warna kuning menunjukkan adanya kesamaan interaksi senyawa alam pada protein dan *native ligand* pada protein tertentu



Gambar 1. Hasil interaksi docking molecular antara (a) native ligand53K dengan protein 5MTP, (b) native ligandXT0 dengan protein 5MTP, (c) native ligand 53K dengan protein 5MTR, (d) native ligand XT0 dengan protein 5MTR, (e) senyawa zinc02040970 (Adas Bintang) terhadap protein 5MTP, dan (f) senyawa Kaempferol (Adas Bintang) terhadap protein 5MTR.



Gambar 2. Hasil interaksi *molecular docking* antara (g) senyawa Euphohelionone (Patikan Kebo) terhadap protein 5MTP, dan (h) senyawa Lupeol (patikan kebo) terhadap protein 5MTR.

4. KESIMPULAN

Tidak ditemukan senyawa yang poten pada senyawa adas bintang dan patikan kebo sebagai anti tuberkulosis sebagai pengganti isoniazid melalui mekanisme penghambatan InhA (*enoyl-acyl carrier protein reductase*).

REFERENSI

- Andrade-Ochoa, S. Nevarez-Morillon, G.V. Sanches-Torres, L.E. Villanueva-Garcia, M. Sanchez-Ramirez, B.E. Rodriguez-Valdez, L.M. Rivera-Chavira, B.E. (2015). Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15(1): 332.
- De, M. (2014). Anti-microbial activities of Indian spices with special reference to Bishops weed Cumin and Star anise. *Asian J. Exp. Sci.* 28 (1): 13–21.
- DiPiro, J.T. Talbert, R.L. Yee, G.C. Matzke, G.R. Wells, B.G. Posey, L.M. (2008). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach. Seventh Edition*. United States: McGrawHill. 1839-1856
- Huang, Y. Zhoa, J.Zhou, L. Wang, J. Gong, Y. Chen, X. Guo, Z. Wang, Q. Jiang, W. (2010). Antifungal activity of the essential oil of *illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules*, 15(11): 7558–7569.
- Matviiuk, T. Rodriguez, F. Saffon, N. Mallet-Ladeira, S. Gorichko, M. Ribeiro, A.L. Pasca, M.R. Lherbet, C. Voitenko, Z. Baltas, M.(2013). Design, chemical synthesis of 3-(9H-fluoren-9-yl)pyrrolidine-2,5-dione derivatives and biological activity against enoyl-ACP reductase (InhA) and *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. pp. 37–48.
- Petterson 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.

- Rajasekar, T. Anbarasu, S. Manikkam, R. Joseph, J. Kumar, V. (2015). Inhibitory activity of *Euphorbia hirta* (Tawa-tawa) extracts against *Mycobacterium tuberculosis* and other non mycobacterial pathogens. *Der Pharma Chemica*, 7(8): 213–216.
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. Diakses pada 23 Desember 2017.
<https://www.rcsb.org/structure/5MTP>
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. Diakses pada 23 Desember 2017.
<https://www.rcsb.org/structure/5MTR>
- 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.
- 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>
- Truhlar, D. G. (2009). Valence Bond Theory for Chemical Dynamics. *Journal of computational chemistry*, 28(1):73–86.
- World Health Organization. (2017). *Global Tuberculosis Report 2017*. Diakses 20 Januari 2018.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/1/9789241565516-eng.pdf?ua=1>