



Molecular Docking of Bioactive Compounds from Wungu Leaves (*Graptophyllum pictum* (L) Griff) as Tyrosinase Inhibitors

Abdul Aziz*, Dimas Andrianto, Mega Safithri

Department of Biochemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, IPB University, West Java, Indonesia

Submitted 25 october 2021; Revised 25 november 2021; Accepted 26 november 2021; Published 30 june 2022

*Corresponding author: abdulargapura@gmail.com

Abstract

Melasma is characterized as a skin disorder by hyperpigmentation of the skin in areas exposed to sunlight. Currently, melasma treatment and cosmetic applications as a whitening agent were carried out by regulating tyrosinase activity through the use of compounds such as kojic acid which poses a health risk. Therefore, it was necessary to have other alternatives that can regulate tyrosinase activity without harming health, one of them is wungu leaves which is become a novelty of this research. This study aimed to determine inhibitory effects of wungu leaves (*Graptophyllum pictum* (L) Griff) bioactive component as an agent to inhibit tyrosinase activity through a molecular docking approach. A total of 28 wungu leaves bioactive components as a result of the analysis of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) were tested for their inhibitory effects on tyrosinase activity. Linolenic acid and phytol were ligands that have the best inhibition on tyrosinase enzyme activity with affinity energies of -5.8 kcal/mol and -5.4 kcal/mol, respectively, and inhibition constants of 55.718 M and 109.489 M. It shows that ligands from wungu leaves have inhibit activity against tyrosinase.

Keywords: *Graptophyllum pictum* L. Griff; hyperpigmentation; melanogenesis; molecular docking; tyrosinase

Penambatan Molekuler Senyawa Bioaktif dari Daun Wungu (*Graptophyllum Pictum* (L) Griff) sebagai Inhibitor Tirosinase

Abstrak

Melasma merupakan kelainan kulit yang ditandai dengan hiperpigmentasi kulit pada daerah yang terpapar sinar matahari. Saat ini pengobatan melasma maupun pemutih dilakukan dengan meregulasi aktivitas tirosinase melalui penggunaan asam kojat yang menimbulkan risiko bagi kesehatan. Oleh sebab itu perlu ada alternatif lain yang dapat meregulasi aktivitas tirosinase tanpa memberikan dampak negatif terhadap kesehatan, salah satunya adalah daun wungu yang menjadi kebaruan dalam penelitian ini. Penelitian ini bertujuan memprediksi daya inhibisi komponen bioaktif daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L) Griff) sebagai agen penghambat aktivitas tirosinase melalui pendekatan penambatan molekuler. Sejumlah 28 komponen bioaktif daun wungu hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dan *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* (GC-FID) diuji daya inhibisinya terhadap aktivitas tirosinase. Asam linolenat dan fitol merupakan ligan uji yang memiliki daya inhibisi terbaik dengan energi afinitas masing-masing sebesar -5,8 kkal/mol dan -5,4 kkal/mol serta konstanta inhibisi 55,718 µM dan 109,489 µM. Hal ini menunjukkan ligan-ligan uji dari daun wungu memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase.

Kata Kunci: *Graptophyllum pictum* L. Griff; hiperpigmentasi; melanogenesis; penambatan molekuler; tirosinase

1. Pendahuluan

Melasma merupakan kelainan kulit yang ditandai dengan hiperpigmentasi kulit pada daerah yang terpapar sinar matahari terutama wajah¹. Melasma termasuk kategori kelainan kulit yang dominan di beberapa negara. Sebuah survey telah dilakukan terhadap 53.343 diagnosis pada beberapa klinik dermatologi di Brazil tahun 2006 oleh *Brazilian Society of Dermatology* (BSD). Hasil survey menunjukkan melasma merupakan kelompok terbesar ketiga penyakit dalam praktik dermatologi. Selain itu sebuah penelitian yang dilakukan di Nepal pada tahun 2008 terhadap 546 orang pasien dermatologi menunjukkan bahwa melasma merupakan kelainan dermatologi yang paling sering dilaporkan. Sementara itu, sebuah studi yang dilakukan di Saudi Arabia terhadap data dari 1076 pasien dermatologi menunjukkan melasma merupakan kelainan dermatologi keempat paling tinggi².

Melasma terjadi karena akumulasi melanin di dalam sel. Pembentukan pigmen melanin atau melanogenesis hakikatnya merupakan fotoprotektif yang paling penting dalam menanggapi radiasi sinar ultraviolet dari matahari dan karsinogenesis. Sehingga hilangnya melanin dan depigmentasi yang abnormal justru dapat menjadi masalah estetika dan dermatologis wajah yang serius pada manusia. Sebaliknya, peningkatan sintesis melanin dan akumulasi pigmen yang berlebih atau dikenal hiperpigmentasi juga dapat menyebabkan berbagai jenis gangguan kulit termasuk diantaranya melasma³. Biosintesis melanin di dalam sel melibatkan sebuah enzim sentral atau rate limiting enzim yaitu tirosinase. Biosintesis melanin dapat direduksi dengan menghambat aktivitas rate limiting enzim dalam lintasan metabolisme melanogenesis. Data Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) 2021 menunjukkan bahwa kosmetik mengalami peningkatan cukup signifikan dalam hal produk yang terdaftar selama periode enam tahun terakhir (2016-2021). Kosmetik mengalami peningkatan yang cukup tinggi dari 0,01% pada tahun 2016 menjadi 57,4% pada tahun 2021. Sejak tahun 2018 sampai

dengan tahun 2021 kosmetik juga merupakan produk dengan prosesntase paling tinggi dibandingkan dengan produk lain seperti obat, obat tradisional, suplemen makanan dan makanan atau minuman⁴.

Senyawa yang saat ini umum digunakan untuk meregulasi aktivitas tirosinase atau inhibitor tirosinase diantaranya adalah asam kojat, hidrokuinon, asam askorbat, arbutin dan merkuri. Asam kojat dalam hal ini merupakan senyawa dengan aktivitas inhibisi yang paling besar dibandingkan dengan senyawa tersebut diatas. Akan tetapi, asam kojat diketahui bersifat karsinogenik. Hasil penelitian menunjukkan aplikasi asam kojat pada konsentrasi 2% secara signifikan meningkatkan hepatokarsinogenesis pada tikus⁵. Penggunaan asam kojat dalam jangka panjang dengan konsentrasi tinggi justru dapat menyebabkan kerusakan pada kulit⁶. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa hidrokuinon menyebabkan kerusakan pada bagian epidermis kulit serta menyebabkan inflamasi pada sel yang terletak pada lapisan kulit yang lebih dalam. Selain itu, hidrokuinon juga menyebabkan inflamasi di sekitar kelenjar sebaceous dan folikel rambut⁷.

Penelitian untuk mengeksplorasi komponen bioaktif alami sebagai inhibitor tirosinase merupakan sebuah kebutuhan yang harus dilakukan guna memperoleh inhibitor tirosinase yang tidak memberikan dampak negatif terhadap kesehatan. Penelitian ini bertujuan menentukan daya inhibisi komponen bioaktif daun wungu sebagai agen penghambat aktivitas tirosinase melalui penambatan molekuler. Pendekatan ini dipilih karena mampu memprediksi konformasi yang cukup optimal antara ligan dengan situs pengikatan protein⁸. Hal ini juga menjadi dasar acuan untuk melakukan penelitian lebih lanjut melalui pendekatan *in vitro*. Daun wungu diharapkan dapat menghambat aktivitas tirosinase berkaitan dengan komponen bioaktif yang dimilikinya.

2. Metode

2.1. Alat

Penelitian dilakukan menggunakan perangkat personal computer dengan spesifikasi

Processor Intel(R) Core™ i3-2350m CPU @ 2.30GHz (4CPUs) ~2.3GHz, memory 2048MB RAM, sistem operasi windows 7. Perangkat lunak yang digunakan MarvinView 6.0.0, BIOVIA Discovery Studio Visualizer v16.1.0.15350, AutoDockTools-1.5.68, Marvin Sketch, Ligplot+ dan PyMOL™ 1.7.4.5 Edu.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah ligan berupa komponen bioaktif daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L) Griff) hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dan *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* (GC-FID) pada beberapa penelitian^{9,10,11,12}. Ligan yang dimaksud terdiri atas asam linolenat, isofitol, asam palmitat, fitol, heksahidrofarnesil aseton, tetrakosan, heptakosan, triakontan, oktakosan, trikosan, nonakosan, pentakosan, heksakosan, n-hentriakontan, stigmasterol, kuersetin, rutin, *stigmast-5-en-3-ol*, β sitosterol, γ tokoferol, skualen, *pyridine-3-carboxamide, propan-2-yl hexadecanoate, (e)-tricos-9-ene*, mirisetin, *2,2,2-trifluoro-1-(p-tolil) etanon* dan benzilamino asetaldehid o-benzil. Asam kojat sebagai kontrol dan tropolon sebagai native ligan serta struktur 3D reseptor enzim tirosinase mutan dengan PDB ID 5m8t. Tirosinase PDB ID 5m8t merupakan struktur protein mutan resolusi lebih baik daripada *wildtype*. Selain itu hasil analisa *in vitro* antara *tyrosinase-related* protein 1 dalam bentuk terkompleks dengan CU (TYRP1-Cu) baik *wildtype* maupun mutan (TYRP1-3M-Cu) keduanya menunjukkan aktivitas tirosinase¹³.

2.3. Preparasi Struktur, Analisis Kelarutan dan Daya Serap Ligan

File struktur 2D ligan diunduh dari laman pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. dalam format *.sdf untuk kemudian dikonversi ke stuktur 3D dalam format *.pdb dengan menggunakan *software Discovery Studio*. Kemudian atom hidrogen ditambahkan dengan menggunakan aplikasi AutoDockTools-1.5.6. Hasil optimasi ini disimpan dalam format *.PDBQT. Analisis stabilitas ligan dilakukan dengan mengacu kepada kelarutan dan daya serap di

dalam tubuh melalui aturan Lipinski dengan mengakses laman <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>.

2.4. Analisis Toksisitas Ligan

Analisis potensi toksisitas ligan dilakukan secara online dengan menggunakan bantuan laman <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1/predict/>. Sampel ligan yang dianalisis diunggah ke laman tersebut kemudian dipilih menu *predict* hingga keluar hasil analisis pada laman yang sama¹⁴.

2.5. Preparasi Struktur Reseptor

Reseptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur enzim tirosinase yang diunduh dari laman NCBI *online database* dengan kode akses 5m8t. Data reseptor diperoleh dalam format *.fasta untuk kemudian diubah ke struktur tiga dimensi dalam format *.pdb dengan menggunakan *software Discovery Studio*. Ligan dan molekul air yang masih terikat dengan reseptor diputus/dihapus kemudian atom hidrogen ditambahkan ke protein atau reseptor dengan menggunakan *software* yang sama yaitu *Discovery Studio* dan hasilnya disimpan dalam format *.fasta. Hasil preparasi kemudian dikonversi ke dalam format *.pdbqt dengan menggunakan aplikasi *AutoDockTools-1.5.6*. Analisis diagram Ramachandran dilakukan secara online menggunakan PROCHECK dengan mengakses laman <http://services.mbi.ucla.edu/>. Struktur 3D 5m8t yang diunduh dari protein data bank diunggah ke laman PROCHECK kemudian diklik “run procheck”.

2.6. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menentukan nilai grid box¹⁵. Dimensi grid box yang digunakan yaitu $x = 16$, $y = 16$, $z = 16$ dengan jarak antar atom 1 Å. Validasi ini dilakukan hingga diperoleh nilai *Root Mean Standard Deviation* (RMSD) kurang dari 2 Å sejumlah minimal 3 nilai dari 20 kali validasi¹⁶.

2.7. Penambatan Molekuler Ligan Uji

Struktur ligan dan reseptor yang

telah dipreparasi disimpan dalam format .pdbqt dan disalin ke folder Vina. Program AutoDockTools-1.5.6 dijalankan melalui *Command Prompt* (CMD). Perintah pemrograman yang dijalankan yaitu “vina –config conf.txt –log log.txt”. Hasil penambatan molekul didapatkan dokumen out dengan format *.pdbqt dan log yang berisi energi afinitas dan RMSD dengan format *.txt.

2.8. Analisis Hasil Penambatan Molekuler

Analisis dilakukan dengan mengacu kepada dokumen out yang memuat data perubahan energi bebas Gibbs (ΔG) serta analisis posisi ligan dengan menggunakan bantuan aplikasi LigPlot+ dan PyMOL. Hasil dari LigPlot+ tersebut merepresentasikan diagram interaksi ligan dengan reseptor. Adapun energi yang diperoleh dari penambatan digunakan untuk keperluan analisa afinitas ligan dengan reseptor serta Konstanta Inhibisi (KI) dari ligan terhadap reseptor. Konstanta Inhibisi ligan diperoleh dari persamaan $\Delta G = RT \ln KI$ (ΔG = Energi bebas gibbs (kkal/mol), $R = 1.986$ kal/molK, $T = 298.15$ K)¹⁷.

3. Hasil

3.1. Struktur, Kelarutan dan Daya Serap Ligan

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan komponen bioaktif tanaman daun wungu hasil analisis GC-MS dan GC-FID. Komponen utama bioaktif daun wungu terdiri atas fitol (75,7 %), n- nonakosan (6,5

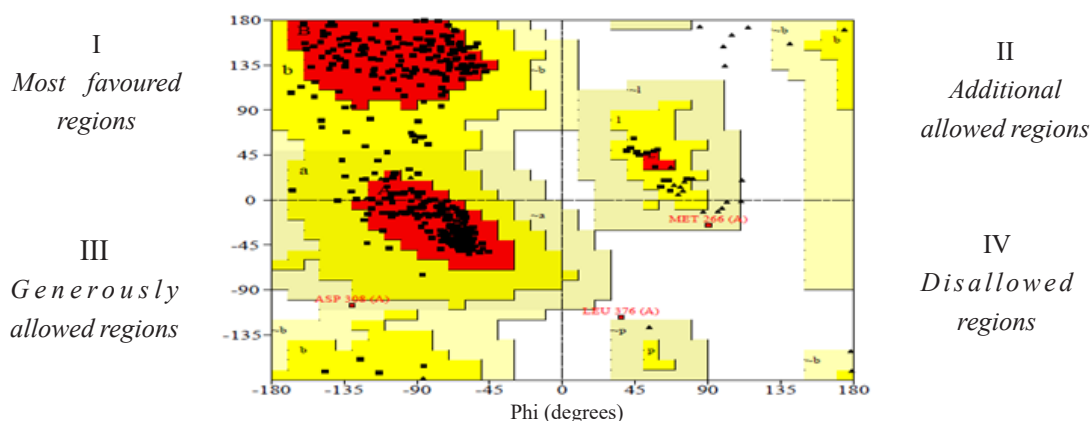
%) dan heksahidrofarnesil aseton (2,6 %)¹⁰. Kelarutan dan daya serap ligan dianalisis dengan menggunakan aturan Lipinski yang terdiri atas massa molekul relatif, donor ikatan hidrogen, akseptor ikatan hidrogen, log P dan refraktivitas molar. Tabel 1 menunjukkan data hasil analisis kelarutan dan daya serap ligan dari daun wungu yang digunakan dalam penelitian. Berdasarkan hasil analisis pada Tabel 1 didapatkan bahwa tidak semua ligan memenuhi aturan Lipinski, beberapa diantaranya memiliki nilai diluar parameter standar pada lebih dari dua parameter.

3.2. Toksisitas Ligan

Analisis toksisitas ligan dilakukan dengan harapan senyawa target yang menjadi kandidat obat dapat bekerja efektif tanpa memberikan dampak negatif bagi organisme pengguna. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan bantuan laman <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1/predict/> untuk memprediksi toksistas setiap ligan yang digunakan dalam penelitian. Parameter kontrol analisis toksisitas yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas inhibisi *human ether a go-go related gene* (herG), karsinogenisitas, dan toksisitas oral akut (Tabel 2).

3.3. Struktur Reseptor

Reseptor yang digunakan dalam penelitian merupakan struktur enzim tirosinase Homo sapiens dengan PDB ID 5m8t yang diperoleh dari laman Protein Data Bank. Struktur enzim tirosinase 5m8t



Gambar 1 Diagram Ramachandran tirosinase (PDB ID : 5m8t)
(sumber : <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>)

Tabel 1. Hasil Analisis Kelarutan dan Daya Serap Ligan Berdasarkan Aturan Lipinski.

Ligan	Massa molekul relatif	Donor ikatan hidrogen	Akseptor ikatan hidrogen	Log P	Refraktivitas molar
tropolon	118,00	2	2	-0,545	27,139
asam kojat	138,00	2	4	-1,446	28,680
stigmasterol	412,00	1	1	7,801	128,123
kuersetin	302,00	5	7	2,011	74,050
mirisetin	318,00	6	8	1,717	75,715
2,2,2-trifluoro-1-(p- tolil) etanon	203,00	1	2	2,634	45,707
rutin	610,00	0	6	-1,879	137,495
β sitosterol	414,00	1	1	8,025	128,217
γ tokoferol	312,00	5	6	-0,053	77,146
stigmast-5-en-3-ol	414,00	1	1	8,025	128,217
benzilamino asetalde- hid o-benzil	254,00	1	3	2,979	77,872
asam linolenat	278,00	1	2	5,661	86,900
skualen	410,00	0	0	10,605	140,060
isofitol	296,00	1	1	6,363	95,540
pyridine-3-carbox- amide	122,00	2	3	0,181	32,755
asam palmitat	256,00	1	2	5,552	77,948
fitol	296,00	1	1	6,364	95,562
heksahidrofarnesil	268,00	0	1	6,015	85,400
aseton					
propan-2-yl hexadec- anoate	298,00	0	2	6,419	91,540
tetrakosan	338,00	0	0	9,608	112,922
(e)-tricos-9-ene	322,00	0	0	8,994	108,211
heptakosan	380,00	0	0	10,779	126,773
triakontan	422,00	0	0	11,949	140,624
oktakosan	394,00	0	0	11,169	131,390
trikosan	324,00	0	0	9,218	108,305
nonakosan	408,00	0	0	11,559	136,007
pentakosan	352,00	0	0	9,999	117,539
heksakosan	366,00	0	0	10,389	122,156
n-hentriakontan	436,00	0	0	12,339	145,241

mengandung logam zinc pada bagian sisi aktifnya yang sekaligus menjadikan enzim ini termasuk dalam kategori metaloenzim¹³. Reseptor dianalisis dengan menggunakan Ramachandran plot (Gambar 1). Ramachandran plot terdiri atas 4 kuadran berbeda yaitu *most favoured regions* (kuadran I), *additional allowed regions* (kuadran II), *generously allowed regions* (kuadran III), dan *disallowed regions* (kuadran IV). Ramachandran plot merupakan *scatter plot* antara ϕ dan ψ , mencerminkan daerah yang diizinkan dari ruang konformasi yang tersedia untuk rantai protein¹⁸.

Tirosinase 5m8t mengalami mutasi pada beberapa residu asam amino. Visualisasi

hasil superimpose antara *wildtype* dan mutan dilakukan untuk mengkonfirmasi ada tidaknya perubahan khususnya pada residu katalitik tirosine. Gambar 2 menunjukkan visualisasi hasil superimpose antara tirosinase mutan (merah) dan *wild type* (hijau). Hasil menunjukkan mutasi tidak menyebabkan perubahan signifikan khususnya pada residu katalitik tirosinase 5m8t. Mutasi terjadi pada residu asam amino urutan ke 338, 350 dan 367 sedangkan situs katalitik tirosinase dengan PDB ID 5m8t terdiri atas residu asam amino His377, His381, His404, His224, His192, dan His215. Kondisi ini didukung oleh hasil analisis *in vitro* antara tirosinase-related protein 1 dalam bentuk terkompleks

Tabel 2. Toksisitas Ligan Kontrol, Ligan Alami dan Ligan Uji Senyawa Bioaktif Daun Wungu.

Ligan	Inhibisi Human Ether-a-go-go-Related Gene		Karsinogenisitas		Toksisitas Oral Akut	
	Kategori	P	Kategori	P	Kategori	P
tropolon	lemah	0,977	nk	0,827	III	0,642
asam kojat	lemah	0,944	nk	0,543	III	0,619
stigmasterol	lemah	0,803	nk	0,918	I	0,429
kuersetin	lemah	0,978	nk	0,945	II	0,735
mirisetin	lemah	0,978	nk	0,945	II	0,735
2,2,2-trifluoro-1-(p-tolil) etanon	lemah	0,962	k	0,607	III	0,722
rutin	lemah	0,981	nk	0,961	III	0,597
β sitosterol	lemah	0,803	nk	0,918	I	0,429
γ tokoferol	lemah	0,719	nk	0,881	III	0,716
stigmast-5-en-3-ol	lemah	0,803	nk	0,918	I	0,429
benzilamino asetal-dehid o-benzil	kuat	0,557	k	0,654	III	0,756
asam linolenat	Lemah	0,882	Nk	0,650	IV	0,639
skualen	Lemah	0,769	k	0,563	III	0,897
isofitol	Lemah	0,906	nk	0,543	III	0,905
pyridine-3-carboxamide	Lemah	0,995	nk	0,910	III	0,786
asam palmitat	Lemah	0,932	nk	0,645	IV	0,638
fitol	Lemah	0,784	nk	0,506	III	0,855
heksahidrofarnesil	Lemah	0,821	k	0,615	III	0,769
aseton	Lemah	0,909	k	0,671	III	0,862
propan-2-yl hexadecanoate	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
tetrakosan	Lemah	0,827	k	0,635	III	0,824
(e)-tricos-9-ene	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
heptakosan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
triakontan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
oktakosan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
trikosan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
nonakosan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
pentakosan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
heksakosan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614
n-hentriakontan	Lemah	0,862	k	0,642	III	0,614

dengan CU (TYRP1-Cu) baik wild type maupun mutan (TYRP1-3M-Cu) keduanya menunjukkan aktivitas tirosinase¹³.

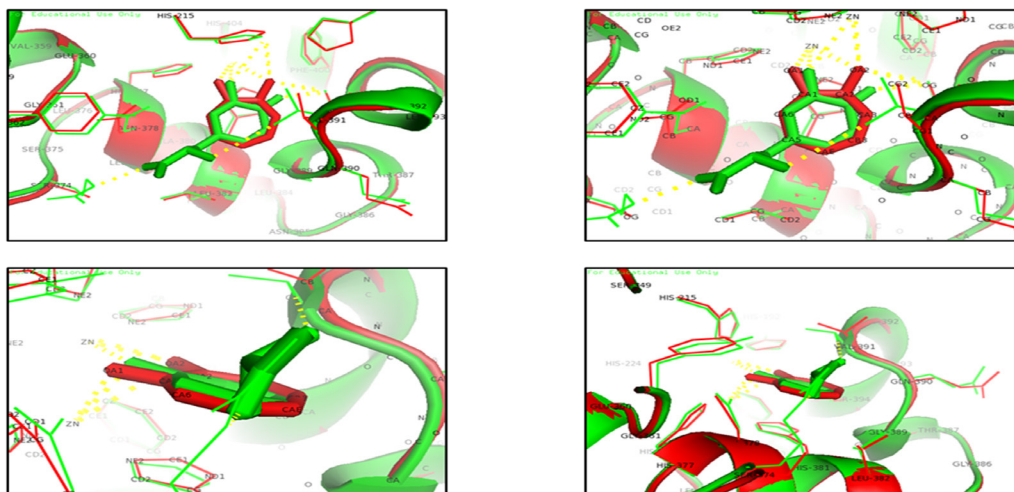
3.4. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menambatkan ulang antara reseptor 5m8t dengan ligan alami tropolon. Hal ini penting dilakukan untuk memperoleh daerah penambatan yang tepat berupa gridbox yang mencakup sisi aktif enzim sebagai target penambatan molekuler. Validasi dilakukan sejumlah 20 kali ulangan. Adapun dimensi gridbox yang digunakan yaitu center_x=121.444, center_y=278.358,

center_z=216.460, size_x=16, size_y=16, size_z=16 dengan jarak antar atom 1 Å.

3.5. Hasil Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler dilakukan untuk melihat nilai energi afinitas setiap ligan uji yang digunakan dalam penelitian. Semakin kecil nilai energi afinitas maka aktivitas penghambatan pada enzim semakin besar. Hasil penambatan molekuler dianalisa lebih lanjut dalam bentuk visualisasi 2D dan 3D untuk melihat interaksi antara ligan dengan reseptor. Data yang diperoleh dari hasil visualisasi 2D dan 3D berupa jenis ikatan, panjang ikatan yang dibentuk, molekul



Gambar 2 Visualisasi hasil superimpose tirosinase mutan PDB ID 5m8t (merah) dan tirosinase wild type PDB ID 5m8n (hijau)

atom pada ligan yang terlibat dalam ikatan antara ligan dengan reseptor dan residu asam amino reseptor yang berinteraksi langsung dengan ligan. Hasil penambatan molekuler ditunjukkan pada Tabel 3.

Analisis lebih lanjut pada hasil penambatan molekuler dilakukan melalui visualisasi dua dimensi dengan bantuan program aplikasi Ligplot+. Hasil ini merepresentasikan residu asam amino dari reseptor yang terlibat dalam interaksi dengan ligan. Identifikasi ikatan hidrogen dan panjang ikatan yang terbentuk serta atom pada asam amino yang terlibat dalam pembentukan ikatan dapat dilihat pada hasil visualisasi dua dimensi. Sementara itu visualisasi tiga dimensi dilakukan dengan bantuan program aplikasi PyMOL untuk melihat lokasi terbentuknya ikatan antara ligan dengan reseptor.

Asam linolenat membentuk tiga ikatan hidrogen dengan residu asam amino tirosinase 5m8t yang juga berperan sebagai situs katalitik. Interaksi ini dapat dilihat pada hasil visualisasi dua dimensi. Interaksi ini juga sekaligus menjadikan asam linolenat sebagai ligan yang memiliki ikatan hidrogen paling banyak dibandingkan dengan ligan uji lain. Selain itu, asam linoleat juga diketahui membentuk dua interaksi hidrofobik dengan residu asam amino tirosinase 5m8t. Gambar 3 menunjukkan visualiasasi interaksi antara asam linolenat dengan reseptor dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi.

4. Pembahasan

4.1. Struktur, Kelarutan, dan Daya Serap Ligan

Upaya eksplorasi obat baru dalam aplikasinya diharapkan senyawa target memiliki aktivitas farmakologis maupun biologis tertentu yang efektif digunakan sebagai obat. Evaluasi terhadap sifat farmakokinetik obat termasuk didalamnya absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi dilakukan dengan menggunakan aturan Lipinski. Aturan ini terdiri atas massa molekul relatif kurang dari 500 Da, donor ikatan hidrogen kurang dari 5, akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10, log P kurang dari 5, dan nilai refraktivitas molar berkisar antara 40-130¹⁹.

Semua ligan termasuk ligan kontrol, ligan uji dan ligan pembanding telah dievaluasi dengan aturan Lipinski. Semua ligan memiliki massa molekul relatif kurang dari 500 Da kecuali rutin. Selain itu donor ikatan hidrogen semua ligan kurang dari 5 kecuali mirisetin, kuersetin, dan γ tokoferol. Akseptor ikatan hidrogen semua ligan kurang dari 5. Sementara itu Log P untuk semua ligan kurang dari 5 kecuali skualen, stigmasterol, (*e*)-tricos-9-ene, β sitosterol, heptakosan, heksakosan, heksahidrofarnesil aseton, isofitol, asam linolenat, n-hentriakontan, nonakosan, oktakosan, asam palmitat, pentakosan, fitol, *propan-2-yl hexadecanoate*, *stigmast-5-en-3-ol*, tetrakosan, triakontan dan trikosan. Adapun

Tabel 3. Energi Afinitas dan Konstanta Inhibisi Ligan Hasil Penambatan Molekuler.

Ligan	Status ligan	ΔG	Konstanta inhibisi (μM)
		Energi Afinitas (kkal/mol)	
tropolon	ligan alami	- 5,3	129,633
asam kojat	ligan pembanding	-5,5	92,476
stigmasterol	ligan uji	-7,8	1,901
kuersetin	ligan uji	-7,7	2,251
mirisetin	ligan uji	-7,5	3,156
2,2,2-trifluoro-1-(p-tolil) etanon	ligan uji	-6,8	10,293
rutin	ligan uji	-6,8	10,293
β sitosterol	ligan uji	-6,6	14,429
γ tokoferol	ligan uji	-6,6	14,429
stigmast-5-en-3-ol	ligan uji	-6,6	14,429
benzilamino asetaldehid o-benzil	ligan uji	-6,5	17,084
asam linolenat	ligan uji	-5,8	55,718
skualen	ligan uji	-5,7	65,969
isofitol	ligan uji	-5,6	78,106
pyridine-3-carboxamide	ligan uji	-5,5	92,476
asam palmitat	ligan uji	-5,4	109,489
fitol	ligan uji	-5,4	109,489
heksahidrofarnesil aseton	ligan uji	-5,2	151,957
propan-2-yl hexadecanoate	ligan uji	-5,1	181,722
tetrakosan	ligan uji	-4,9	254,74
(e)-tricos-9-ene	ligan uji	-4,7	357,098
heptakosan	ligan uji	-4,6	422,797
triakontan	ligan uji	-4,6	422,797
oktakosan	ligan uji	-4,5	500,584
trikosan	ligan uji	-4,5	500,584
nonakosan	ligan uji	-4,4	592,682
pentakosan	ligan uji	-4,4	592,682
heksakosan	ligan uji	-4,3	701,725
n-hentriakontan	ligan uji	-4,3	701,725

nilai refraktivitas molar semuanya ada dalam rentang 40-130 kecuali asam kojat, tropolon, skualen, n-hentriakontan, nonakosan, oktakosan, *pyridine-3-carboxamide*, rutin dan triakontan. Lipinski *et al.* (2012) menyatakan bahwa suatu senyawa termasuk kategori memiliki permeabilitas yang buruk jika senyawa tersebut memiliki dua parameter di luar jangkauan. Hasil analisis Lipinski menunjukkan terdapat enam senyawa dengan dua parameter di luar jangkauan yaitu rutin, skualen, triakontan, oktakosan, nonakosan dan n-hentriakontan.

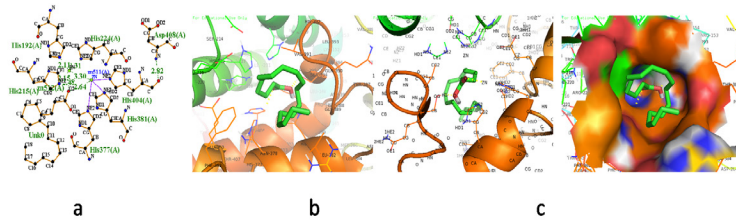
4.2. Toksisitas Ligan

Hasil uji inhibisi herG menunjukkan bahwa *benzylamino-acetaldehyde O-benzyl* termasuk dalam kategori inhibitor kuat terhadap herG, sedangkan ligan uji lainnya merupakan inhibitor lemah. Klasifikasi

karsinogenesis berdasarkan *International Agency for Research on Cancer* (IARC) terdiri atas 4 golongan, yaitu golongan I (*carcinogen*), golongan IIA (*probably carcinogenic*), golongan IIB (*possibly carcinogenic*), golongan III (tidak terklasifikasi), dan golongan IV (*non carcinogenic*)²⁰. Sejumlah lima ligan uji termasuk dalam kategori I dan II dalam hal toksisitas oral akut. Ligan yang dimaksud yaitu stigmasterol, kuersetin, mirisetin, β sitosterol dan *stigmast-5-en-3-ol* dengan probabilitas masing masing-masing sebesar 0,429; 0,735; 0,735; 0,429; dan 0,429.

4.3. Struktur Reseptor

Analisis protein dilakukan menggunakan diagram Ramachandran yang didasarkan pada struktur sekunder protein. Suatu struktur protein dinyatakan baik jika jumlah plot residu asam amino non glisin



Gambar 3. Interaksi asam linolenat dengan reseptor (a) visualisasi 2D, (b) visualisasi 3D model pengisi ruang, (c) visualisasi 3D model pita

yang terdapat pada daerah yang disukai lebih dari 90% dan residu asam amino pada kuadran IV kurang dari 20%²¹. Kualitas struktur sebuah protein dinyatakan baik jika residu asam amino yang berada pada daerah yang disukai semakin besar dan presentase residu asam amino pada daerah yang tidak diizinkan semakin rendah. Diagram Ramchandran mengelompokkan residu asam amino pembentuk struktur sekunder protein berdasarkan sudut phi dan psi. Rantai utama ikatan N-C α dan C α -C pada polipeptida relatif berputar bebas dan rotasi ini masing-masing disebut dengan sudut torsi phi dan psi.

Diagram Ramchandran merepresentasikan polipeptida yang secara sistematis memvariasikan sudut phi dan psi dengan tujuan mendapatkan konformasi yang stabil. Konformasi struktur dianalisis melalui kontak plot antar atom²². Phi menyatakan sumbu x dan psi menyatakan sumbu y dari residu asam amino suatu struktur protein. Hasil analisis berdasarkan Ramchandran plot menunjukkan bahwa residu asam amino reseptor yang berada pada kuadran I sebesar 84,7%, kuadran II sebesar 14,5%, kuadran III sebesar 0,5% dan kuadran IV sebesar 0,3%. Hasil ini menunjukkan bahwa struktur tirosinase dengan PDB ID 5m8t memiliki kualitas yang baik untuk dapat digunakan sebagai reseptor dalam penambatan molekuler karena residu asam amino pada kuadran IV kurang dari 20%²¹.

Warna yang berbeda pada masing-masing kuadran merepresentasikan sebaran asam amino sesuai struktur sekunder protein. Daerah steril pada kuadran IV ditunjukkan oleh area putih, yaitu area yang tidak diizinkan untuk semua asam amino kecuali glisin karena tidak memiliki rantai samping. Daerah merah yaitu daerah yang diperbolehkan untuk

konformasi alfa-heliks, beta *turn* dan beta *sheet*, sesuai dengan konformasi tidak adanya benturan sterik. Daerah kuning berkorelasi dengan konformasi atom dalam protein lebih dekat dibandingkan jumlah jari-jari *Van der waals*. Daerah yang tidak diizinkan pada umumnya melibatkan hambatan sterik antara rantai samping gugus C-beta metilen dan rantai utama atom. Glisin tidak memiliki rantai samping, oleh sebab itu dapat berada pada sudut phi dan psi kuadran IV diagram Ramchandran²². Residu asam amino tirosinase PDB ID 5m8t dominan berada pada kuadran I dan kuadran II (Gambar 1).

Struktur tirosinase dengan PDB ID 5m8t merupakan struktur mutan dengan mutasi pada residu asam amino urutan ke 338, 350 dan 367. Mutasi ini menghasilkan *albinisme okulokutaneus* (OCA), satu kelompok gangguan resesif autosomal yang ditandai dengan berkurangnya produksi melanin di kulit, rambut dan mata¹³. Tirosinase 5m8t mutan digunakan dalam penelitian ini karena memiliki resolusi yang lebih baik daripada tirosinase *wild type* yaitu 2,35 Å dan Ramchandran outliers 0,1% dengan ligan alami berupa tropolon. Beberapa syarat reseptor yang baik diantaranya adalah memiliki ligan alami, struktur kristal dan resolusi $\leq 2,5$ Å²³. Gambar 2 menunjukkan hasil superimpose antara tirosinase mutan dengan PDB ID 5m8t (merah) dan tirosinase *wild type* PDB ID 5m8n (hijau).

Data merujuk kepada kondisi bahwa mutasi diharapkan tidak berdampak signifikan terhadap perubahan pada bagian sisi katalitik enzim tirosinase dengan PDB ID 5m8t. Tampak dalam visualisasi tiga dimensi residu asam amino antara tirosinase 5m8t dengan residu asam amino 5m8n saling berhimpitan satu sama lain. Perbedaan tampak pada ligan

alami dari masing-masing enzim. Tirosinase 5m8t memiliki ligan alami tropolon sementara tirosinase 5m8n memiliki ligan alami asam kojat. Hasil analisis *in vitro* antara tyrosinase-related protein 1 dalam bentuk terkompleks dengan CU (TYRP1-Cu) baik *wild type* maupun mutan (TYRP1-3M-Cu) keduanya menunjukkan aktivitas tirosinase¹³.

4.4. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi terhadap metode penambatan molekuler dilakukan dengan melihat data *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dari 20 kali pengulangan proses docking. Metode penambatan molekuler dapat dikatakan valid jika nilai RMSD kurang dari sama dengan 2 Å¹⁶. Nilai RMSD merepresentasikan perbandingan antara konformasi aktual dengan konformasi hasil penambatan molekuler, dengan demikian RMSD juga mencerminkan tingkat akurasi sebuah metode penambatan molekuler²⁴. Hasil validasi metode penambatan molekuler dengan melibatkan reseptor 5m8t dan ligan alaminya diperoleh rata-rata nilai RMSD sebesar 1,61 Å dan energi afinitas sejumlah -5,3 kkal/mol. Hasil tersebut sekaligus menunjukkan bahwa metode penambatan molekuler tersebut termasuk dalam kategori valid. Nilai RMSD yang semakin kecil merepresentasikan posisi atom pada ligan semakin baik karena mendekati konformasi asal.

4.5. Hasil Penambatan Molekuler

Energi afinitas antara ligan dengan reseptor merupakan salah satu parameter untuk menentukan kualitas ligan yang digunakan dalam penambatan molekuler. Energi afinitas yang rendah merepresentasikan interaksi antara ligan dengan reseptor dapat terjadi dengan lebih mudah. Menurut kaidah termodinamika jika energi bebas Gibbs bernilai negatif atau kurang dari nol maka reaksi kimia dapat terjadi spontan. Ligan yang memiliki nilai energi afinitas lebih rendah dapat lebih mudah berinteraksi dengan reseptor daripada ligan yang memiliki energi afinitas lebih tinggi. Energi afinitas yang semakin rendah memiliki korelasi positif dengan nilai konstanta inhibisi.

Semakin rendah nilai energi afinitas maka nilai konstanta inhibisi juga semakin rendah. Tabel 3 menunjukkan ligan dari komponen bioaktif daun wungu beserta energi afinitas dan konstanta inhibisinya.

Analisis hasil penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan bantuan program aplikasi Ligplot+ dan PyMOL^(TM) 1.7.4.5 Edu. Asam kojat sebagai pembanding membentuk tiga ikatan hidrogen dengan reseptor melalui residu asam amino Ser394 (O₃), Ser394 (O₂) dan Asn378 dengan jarak ikatan masing-masing 2,86 Å, 3,15 Å, dan 3,00 Å. Asam kojat juga membentuk interaksi hidrofobik dengan residu asam amino His377, His215, Gly388, Gln390, Val391, Gly389, dan His381. Sementara itu tropolon sebagai ligan alami membentuk ikatan hidrogen dengan reseptor melalui residu asam amino Ser394 dengan jarak 2,71 Å. Adapun pada interaksi hidrofobik tropolon dengan reseptor melibatkan residu asam amino His192, His377, His215, Asn378, Gln390, Val391, His38, dan Gly389.

Proses penambatan molekuler dilakukan pada daerah situs katalitik enzim tirosinase. Lai *et al.* (2017) menyatakan bahwa situs katalitik tirosinase dengan PDB ID 5m8t terdiri atas residu asam amino His377, His381, His404, His224, His192, dan His215. Hal ini menjadi acuan untuk menentukan kualitas ligan uji yang digunakan dalam penambatan molekuler. Ligan uji asam linolenat dan fitol menunjukkan interaksi melalui ikatan hidrogen yang lebih dominan dibandingkan dengan ligan uji lainnya. Asam linolenat membentuk tiga ikatan hidrogen dengan reseptor melalui residu asam amino His192, Ser394 dan His215 dengan jarak ikatan masing-masing yaitu 3,15 Å, 2,85 Å, dan 3,14 Å. Dua diantara residu asam amino tersebut merupakan bagian dari situs katalitik tirosinase yaitu His192 dan His215. Sementara itu fitol membentuk dua ikatan hidrogen dengan reseptor melalui residu asam amino His 192 dan His 215 dengan jarak ikatan masing-masing yaitu 3,21 Å, dan 3,12 Å. Kedua residu asam amino tersebut merupakan bagian dari situs katalitik tirosinase.

Disisi lain asam linolenat juga membentuk interaksi hidrofobik dengan residu asam amino His381, Gly389, Val391, Asn378, His377, Glu216, Phe362, Leu382, dan Phe400. Demikian pula halnya dengan fitol yang membentuk interaksi hidrofobik dengan residu asam amino Ser394, His381, Gly389, Val391, Asn378, Phe362, Leu382, dan Phe400. Asam linolenat dan fitol merupakan ligan uji terbaik dalam kasus komponen bioaktif daun wungu berkaitan dengan interaksinya dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase.

5. Kesimpulan

Ligan-ligan uji dari daun wungu yang digunakan dalam penambatan molekular pada penelitian ini, yaitu senyawa asam linolenat dan fitol terbukti memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase dengan energi afinitas masing-masing sebesar -5.8 kkal/mol dan -5.4 kkal/mol serta konstanta inhibisi 55,718 μ M dan 109,489 μ M. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk melakukan penelitian selanjutnya tentang aktivitas inhibisi daun wungu terhadap enzim tirosinase melalui pendekatan *in vitro*.

Pustaka

1. Arrowitz C, Schoelermann AM, Mann T, Jiang LI, Weber T. Effective tyrosinase inhibition by thiamidol results in significant improvement of mild to moderate melasma. *J Invest Dermatol*. 2019;139(8):1691–98.
2. Handel AC, Miot LDB, Mio HA. Melasma : a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*. 2014;89(5):771–82.
3. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Saboury AA. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2019;34(1):279–309.
4. [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. Statistik Produk yang Mendapat Persetujuan Izin Edar. Jakarta (ID): BPOM; 2021.
5. Ashooriha M, Khoshneviszadeh M, Khoshneviszadeh M, Rafiei A, Kardan M, Yazdian-Robati R, Emami S. Kojic acid-natural product conjugates as mushroom tyrosinase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2020;201:112480.
6. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:582-593
7. Owolabi JO, Fabiyi OS, Adelakin LA, Ekwerike MC. Effects of skin lightening cream agents – hydroquinone and kojic acid , on the skin of adult female experimental rats. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13283–289.
8. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455–61.
9. Rustini NL, Ariati NK. Identification of active antioxidant Compounds from ungu leaf ethanol extract (*Graptophyllum pictum* L. Griff). *J Heal Sci Med*. 2018;2(1):9–12.
10. IJiangseubchatveera N, Liawruangrath B, Liawruangrath S. The chemical constituents and the cytotoxicity , antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Graptophyllum pictum* (L .) Griff . *J Essent Oil Bear Plants*. 2015;18(1):11–7.
11. Budiaji A, Ismail, Nani H. Identification compound contained in extract methanol leaf wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff). *Int J Heal Med Curr Res*. 2018;3(3):961–64.
12. Aulia Z, Khamid M, Aninjaya M. Analisis kandungan flavonoid ekstrak etanol 70% simplisia daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) dengan metode kromatografi lapis tipis densitometri. *J Ilmu Kesehat Stikes Duta Gama Klaten*. 2019;10(2):81–8.
13. Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Enzyme structure and function very important paper structure of human tyrosinase related protein 1 reveals a binuclear zinc active site important for melanogenesis. *Angew Chem Int*.

- 2017;569812–9815.
14. Ochieng PJ, Sumaryada T, Okun D. Molecular docking and pharmacokinetic prediction of herbal derivatives as maltase-glucoamylase inhibitor. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(9):392–98.
 15. Anitha K, Gopi G, Girish, Kumar PS. Molecular docking study on dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Int J Res Dev Pharm Life Sci.* 2013;2(5):602–10.
 16. Purnomo H. *Kimia Komputasi Uji In Silico Senyawa Anti Kanker.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2013.
 17. Ortiz CLD, Completo GC, Nacario RC, Nellas RB. Potential Inhibitors of galactofuranosyltransferase 2 (GlfT2): molecular docking , 3D-QSAR , and in silico ADMETox studies. *Sci Reports Nat Res.* 2019;9(17096):1–28.
 18. Najibi MS, Maadooliat M, Zhou L, Huang JZ, Gao X. Protein structure classification and loop modeling using multiple Ramachandran distributions. *Comput Struct Biotechnol J.* 2017;15:243–254.
 19. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:4–17.
 20. Tarone RE. On the International Agency for Research on Cancer classification of glyphosate as a probable human carcinogen. *Eur J Cancer Prev.* 2018;27(1):82-87.
 21. Carugo O, Djinoić-Carugo K. Half a century of Ramachandran plots Half a century of Ramachandran plots. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2013;68:1333–41.
 22. DasGupta D, Kaushik R, Jayaram B. From Ramachandran Maps to Tertiary Structures of Proteins. *J Phys Chem B.* 2015;119(34):11136–45.
 23. Aarthi M, Singh SK. Discovery of Potent Inhibitors for the Inhibition of Dengue Envelope Protein: An In Silico Approach. *Curr Top Med Chem.* 2018;18(18):1585-1602.
 24. Dhanik A, McMurray JS, Kavraki LE. DINC : A new AutoDock-based protocol for docking large ligands. *Bio Med Cent Struct Biol.* 2013;13(1):1–14.