Trad. Med. J., January 2015
Vol. 20(1), p 7-15
ISSN : 1410-5918

Submitted : 12-12-2014
Revised : 15-01-2015
Accepted : 10-03-2015

SCRINING IN SILICO ACTIVE COMPOUND OF *Pachyrrhizus erosus AS* ANTITIROSINASE ON *Aspergillus oryzae* (COMPUTATTIONAL STUDY WITH HOMOLOGY MODELING AND MOLECULAR DOCKING)

SKRINING *IN SILICO* SENYAWA AKTIF BENGKOANG (*Pachyrrhizus erosus*) SEBAGAI ANTITIROSINASE PADA *Aspergillus oryzae* (STUDI KOMPUTASIONAL DENGAN *HOMOLOGY MODELING* DAN *MOLECULAR DOCKING)*

Endang Lukitaningsih*, Aditya Wisnusaputra, B.S. Ari Sudarmanto
Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Skip Utara 55201, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Bengkoang has been widely used in the cosmetics industry as a whitening agent. Based on research by Lukitaningsih (2009), bengkoang contains 6 active compounds that acts as a inhibitors of the Aspergillus oryzae (TyrAo) tyrosinase enzyme. However, the interaction between the active compounds in bengkoang and the enzyme tyrosinase has not been known yet. Interaction between bengkoang's active compounds and TyrAo enzyme can be identified by computational studies (in silico). The interaction is conducted using homology modeling and molecular docking. Homology modeling performed to design a three-dimensional (3D) model of Aspergillus oryzae tyrosinase enzyme (TyrAo) using a template form of known 3D structure of TyrAb enzyme (PDBID: 2Y9X). TyrAo model used as target macromolecules in molecular docking method. Molecular docking method is a method to describe ligand (active compounds) position on the active receptor (TyrAo model). Based on the docking results, it is known that residues interacting on the active site of tyrosinase enzyme were Thr275 and His294 residues. The Thr275 made a hydrogen bonding, while the His294 residue made a hydrophobic interaction on the aromatic ring. Experiments in silico and in vitro have been done; the results exhibited a good correlation of them with R^2 value of -0.8366. This correlation indicates that the activity of the active compounds in Bengkoang was similar with the results of them in silico and in vitro studies.
Keywords: anti tyrosinase, homology modeling, Bengkoang (Pachyrrhizus erosus), molecular docking

ABSTRAK

Bengkoang telah banyak digunakan dalam industri kosmetika sebagai whitening agent. Berdasarkan penelitian Lukitaningsih (2009), bengkoang mengandung 6 senyawa aktif yang mampu berperan sebagai whitening agent dengan menghambat aktivitas enzim tirosinase dari jamur Aspergillus oryzae (TyrAo). Namun interaksi senyawa aktif bengkoang dalam menghambat enzim tirosinase belum dapat diketahui. Interaksi senyawa-senyawa aktif bengkoang dengan enzim TyrAo dapat diketahui dengan studi komputasional (in silico). Pemodelan interaksi senyawa aktif bengkoang dengan enzim TyrAo dilakukan dengan metode homology modeling dan molecular docking. Homology modeling dilakukan untuk memodelkan struktur tiga dimensi (3D) enzim tirosinase Aspergillus oryzae (TyrAo) melalui template berupa protein homolog yang sudah diketahui struktur 3D-nya yaitu enzim TyrAb (PDBID: 2Y9X). Model TyrAo digunakan sebagai target makromolekul dalam metode molecular docking. Metode molecular docking merupakan metode untuk menggambarkan posisi ligan (senyawa-senyawa aktif bengkoang) pada sisi aktif reseptor (model TyrAo). Berdasarkan docking yang dilakukan diketahui bahwa residu-residu yang banyak berpengaruh pada interaksi ligan pada sisi aktif adalah residu Thr275 yang berinteraksi secara ikatan hidrogen dengan ligan dan residu His294 yang berinteraksi secara hidrofobik pada cincin aromatik ligan. Penelitian in silico dan in vitro yang telah dilakukan memiliki korelasi (R^2) sebesar -0,8366. Korelasi ini menandakan bahwa aktivitas senyawa-senyawa aktif pada bengkoang dalam menghambat enzim TyrAo memiliki hasil yang serupa pada penelitian yang dilakukan secara in silico dan in vitro.
Kata kunci: antitirosinase, homology modeling, Bengkoang (Pachyrrhizus erosus), molecular docking

Corresponding author : Endang Lukitaningsih
E-mail: lukitaningsih_end@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kosmetika adalah bahan atau sediaan yang dimaksudkan untuk digunakan pada bagian luar tubuh manusia (epidermis, rambut, kuku, bibir, dan organ genital bagian luar), atau gigi dan membran mukosa mulut, terutama untuk membersihkan, mewangikan, mengubah penampilan, dan/atau memperbaiki bau badan atau melindungi atau memelihara tubuh pada kondisi baik (Anonim, 2010). Penggunaan kosmetika telah dilakukan sejak zaman dahulu hingga saat ini. Kosmetika mengalami perkembangan dari sebuah sediaan yang hanya digunakan tanpa memberikan pengaruh pada struktur dan fungsi tubuh hingga menjadi sebuah kosmesetika yang merupakan produk perpaduan dari kosmetika dan bahan farmasetik yang mempunyai aktivitas biologis dan diaplikasikan secara topikal, seperti: krim, lotion, dan salep. Selain itu, dikembangkan pula produk kosmetik dipadu dengan bahan farmasetik yang cara penggunaannya secara per oral maupun parenteral yang disebut sebagai nutrikosmetika.

Kegunaan kosmetik yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat adalah kemampuan untuk mencerahkan kulit pemakainya. Kemampuan mencerahkan kulit dipengaruhi kemampuan kosmetik dalam menghambat proses melanogenesis. Melanogenesis merupakan proses pembentukan melanin oleh tubuh yang selanjutnya melanin akan ditransfer ke kulit bagian luar yang akan terlihat sebagai warna gelap pada kulit. Proses melanogeneis ini akan terpacu oleh paparan sinar UV yang menyebabkan produksi melanin meningkat (Svenson, *et al.,* 2000). Pembentukan melanin sebenarnya adalah sebuah *defense system* dalam rangka menghadapi paparan sinar UV (Aroca, et al., 1993). Namun, melanin menimbulkan warna gelap yang tidak diinginkan oleh sebagian besar masyarakat, terutama orang Indonesia (Asia).

Mekanisme *whitening agent* pada umumnya dikaitkan dengan kemampuan kosmetika dalam menghambat biosintesis melanin atau melanogenesis. Dalam proses melanogenesis, substrat tirosin dikonversi menjadi L-DOPA yang akan dikonversi lebih lanjut menjadi dopakuinon. Kedua konversi tersebut dibantu oleh enzim tirosinase. Dopakuinon yang terbentuk dikonversi lebih lanjut menjadi melanin yang memberikan warna gelap pada kulit (Anonim, 2011). Melanogenesis mempunyai titik kritis pada konversi tirosin menjadi L-DOPA dan konversi L-DOPA menjadi dopakuinon yang dikatalisis oleh enzim tirosinase. Penghambatan enzim tirosinase diharapkan dapat menurunkan aktivitasnya sehingga konversi substrat pada proses melanogenesis menjadi berkurang. Dengan menurunnya konversi substrat maka dapat menghambat bertambahnya jumlah melanin yang terbentuk sehingga tidak terjadi warna gelap pada kulit (Aroca, et al., 1993).

Pemodelan homologi merupakan metode pemodelan struktur 3D protein berdasarkan kemiripan homologinya (Sánchez, et al., 2000). Pemodelan homologi menggunakan protein homolog yang telah diketahui struktur 3D-nya sebagai *template* dalam memodelkan urutan asam amino protein target. Beberapa enzim tirosinase dari organisme lain telah diketahui struktur 3D-nya, antara lain: *Tyr*Bm, *Tyr*Sc, dan *Tyr*Ab. Struktur-struktur 3D enzim tirosinase tersebut diduga memiliki kemiripan homologi dengan enzim *Tyr*Ao sehingga pemodelan homologi terhadap *Tyr*Ao dapat dilakukan (Wisnusaputra, 2012).

Interaksi senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam bengkoang terhadap model *Tyr*Ao dianalisis dengan metode *docking*. *Docking* merupakan penambatan ligan pada *cavity* tertentu suatu protein (Ahmed, et al., 2007). Pada umumnya *docking* dilakukan untuk memodelkan penghambatan protein, baik enzim maupun reseptor, secara kompetitif dengan menggunakan *cavity* sisi aktif protein. *Docking* akan menghasilkan *pose* yang menentukan interaksi ligan dengan protein target dan *score* yang menentukan afinitas interaksi ligan-protein. Dengan dilakukan *docking* dapat diketahui residu-residu yang berinteraksi dengan ligan untuk selanjutnya dapat dieksplorasi lebih lanjut mengenai fitur-fitur farmakofor ligan dalam rangka mengembangkan *whitening agent* yang lebih poten (Claverie and Notredame, 2006).

METODOLOGI

Bahan dan alat

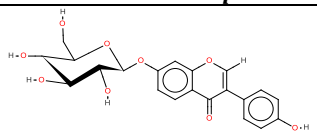
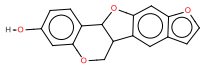
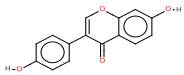
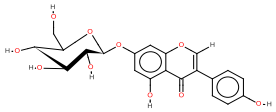
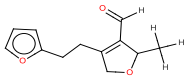
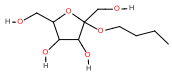
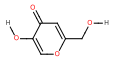
Sekuens asam amino target (*Aspergillus oryzae)* didapat dari situs: www.uniprot.org. Struktur 3D *template* didapatkan dari situs http://www.rscb.org/pdb. Struktur senyawa aktif bengkoang (Tabel I) didapatkan dari hasil penelitian Lukitaningsih (2009)

Metode

Pemilihan template *homology modeling*

Pemilihan template pemodelan homologi dilakukan dengan melakukan *query* pada basis data BLAST (http://blast.ncbi .nlm.nih.gov) dan SAS (www.ebi.ac.uk/ thornton-srv/databases/sas). Luaran dari proses *query* (hit) yang didapat berupa daftar struktur 3D protein yang memiliki kemiripan homologi dengan protein target (*Tyr*Ao).

Tabel. I Daftar senyawa aktif bengkoang

Compound code	*Chemical Structure Compound name*	*IC_{50}*
A1	 *Daidzein-7-O-ßglucopyranose*	22.20±0.27mM
A2	 *(8,9)-Furanylpterocarpan-3-ol*	7.19±0.11mM
A3	 *Daidzein*	5.35 ± 0.03mM
A4	 *5-Hydroxyldaidzein-7-O-ßglucopyranose*	4.38±0.01mM
A5	 *4-(2-(Furane-2-yl)ethyl)-2-methyl-2,5-dihydrofurane-3-carbaldehyde*	0.198± 0.004mM
A6	 *2-Butoxy-2,5-bis(hydroxymethyl)-tetrahydrofurane-3,4-diol*	1.21±0.02mM
A7	 *Kojic acid*	1.21±0.02mM

Sequence alignment target (*Tyr*Ao) terhadap template

Sequence alignment dilakukan pada sekuens target (*Tyr*Ao) terhadap template. *Sequence alignment* dilakukan berdasarkan pada 3 piranti lunak penjajaran yang berbeda, yaitu: BLAST, MOE, dan SAS.

Pemodelan homologi target (*Tyr*Ao) terhadap template

Pemodelan homologi dilakukan pada target (*Tyr*Ao) terhadap template dengan menggunakan piranti lunak MOE 2010.10. Tahap ini diawali dengan melakukan preparasi pada template sesuai dengan data eksperimental yang tersedia menurut Ismaya *et al.* (2011). Tahap pemodelan homologi selanjutnya dilakukan secara otomatis oleh piranti lunak MOE dengan menggunakan *forcefield* AMBER99. Pemodelan homologi menghasilkan luaran berupa model *Tyr*Ao BLAST, *Tyr*Ao MOE, dan *Tyr*Ao SAS.

Evaluasi model *Tyr*Ao

Evaluasi model *Tyr*Ao dilakukan dengan menggunakan plot Ramachandran dan piranti lunak berbasis web ProSA. Evaluasi dengan plot Ramachandran dilakukan dengan menghitung jumlah outlier yang muncul. Evaluasi ini mengandung asumsi bahwa keberadaan outlier di variable region dapat diabaikan. Evaluasi dengan piranti lunak ProSA dilakukan dengan mengunggah model *Tyr*Ao pada server ProSA yang kemudian akan dianalisis secara otomatis oleh piranti lunak dan menghasilkan luaran berupa Z-score dan plot energy residu model *Tyr*Ao. Tahapan akhir dari evaluasi adalah menentukan model terbaik dari ketiga model *Tyr*Ao BLAST, *Tyr*Ao MOE, dan *Tyr*Ao SAS yang mana model terbaik digunakan sebagai reseptor dalam docking senyawa-senyawa aktif bengkoang.

Preparasi ligan dan reseptor

Preparasi ligan dilakukan dengan menggambar ligan secara 2D pada piranti lunak

Tabel II. Evaluasi struktur 3D model *Tyr*Ao dengan menggunakan plot Ramachandran

Model	*Outliers*		Total
	Conserved region	*Variable region*	
*Tyr*Ao BLAST	0	31	31
*Tyr*Ao MOE	2	26	28
*Tyr*Ao SAS	2	27	29

MOE 2010.10 yang selanjutnya dioptimasi menjadi struktur 3D dengan menggunakan *forcefield* MMFF94X. Preparasi reseptor dilakukan secara otomatis pada tahap *homology modeling.*

Penentuan sisi aktif model *TyrAo*

Penentuan sisi aktif model *Tyr*Ao dilakukan secara visual yang mana ceruk yang digunakan sebagai sisi aktif ditandai dengan adanya senyawa *native ligand* (tropolon) dan 2 atom Cu pada ceruk.

Molecular docking

Docking dilakukan dengan piranti lunak MOE 2010.10. Ligan yang digunakan berupa *dataset* senyawa-senyawa aktif bengkoang terpreparasi. Reseptor yang digunakan adalah model *Tyr*Ao terbaik. Sisi aktif ditentukan berdasarkan keberadaan *native ligand* (tropolon). Metode penambatan yang digunakan adalah *AlphaPMI*. *Scoring fucnction* yang digunakan adalah *affinityDG* dengan memberikan *constraint* berupa nilai lebih pada *pose* yang memiliki interaksi dengan atom Cu. Luaran dari *docking* berupa *pose* ligan pada sisi aktif dan *score* afinitasnya.

Analisis hasil *docking*

Analisis hasil *docking* dilakukan pada *pose* dan *score* yang dihasilkan. Pada analisis *pose* dilakukan analisis terhadap residu-residu yang berinteraksi dengan ligan. Sedangkan pada analisis *score* ditentukan korelasi penelitian secara *in silico* dan *in vitro*.

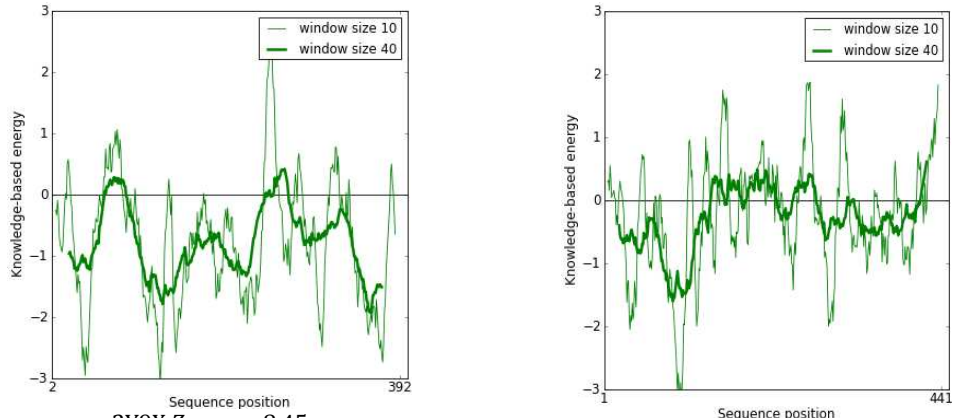
HASIL DAN PEMBAHASAN

Template *homology modeling* ditentukan berdasarkan pertimbangan persen kemiripan (% *identity*) tertinggi, *score* tertinggi, *E-value* terendah (Claverie, *et al.* 2006), dan resolusi struktur 3D *template* terbaik (Drenth, 2007). Dari *hit* yang didapat ditentukan bahwa struktur 3D enzim tirosinase *Agaricus bisporus* (PDBID: 2Y9X) merupakan *template* yang paling sesuai. Struktur 3D enzim tirosinase *Agaricus bisporus* dengan PDBID: 2Y9X memiliki inhibitor tropolon pada sisi aktif enzim yang berguna sebagai penuntun pada pembentukan sisi aktif pada model enzim tirosinase *Aspergillus oryzae* (*Tyr*Ao) untuk menghasilkan model sisi aktif yang sesuai dengan hasil eksperimental.

Sequence alignment dilakukan pada urutan asam amino enzim tirosinase *Aspergillus oryzae* terhadap *template* 2Y9X untuk mendapatkan posisi residu yang sesuai terhadap *template*. Tahap *sequence alignment* merupakan langkah penting yang akan menentukan kualitas dari model struktur 3D protein (Sánchez, *et al.,* 2000). *Sequence alignment* dilakukan berdasarkan 3 piranti lunak digunakan, yaitu: BLAST, MOE, dan SAS.

Pemodelan homologi dilakukan menggunakan piranti lunak MOE 2010.10. Pemodelan homologi diawali dengan melakukan preparasi terhadap template *Tyr*Ab (PDBID: 2Y9X). Tiap-tiap atom Cu^{2+} pada sisi aktif dikoordinasi oleh 3 residu histidin. Atom CuA dikoordinasi oleh residu His61, His85, dan His94. Sedangkan atom CuB dikoordinasi oleh residu His259, His263, dan His296. Pada residu Cys83 dan rantai samping residu His85 terdapat ikatan tioeter yang membatasi pergerakan rantai samping His85. Residu Phe90 memberikan tahanan pada His85, His259, dan His263. Sedangkan residu Phe292 memberikan tahanan pada His61, His94, dan His296. Tahanan-tahanan tersebut berfungsi dalam mempertahankan bentuk sisi aktif enzim tirosinase. Pada sisi aktif enzim *Tyr*Ab terdapat molekul air yang membentuk jembatan air antara 2 atom Cu. Adanya jembatan air menandakan bahwa *template* yang digunakan berada pada kondisi *met*.

Ketiga model *Tyr*Ao dianalisis secara kualitatif dengan plot Ramachandran (Tabel II) dan piranti lunak berbasis web ProSA (Sippl, 1993 and Wiederstein, *et al.,* 2007). Parameter kualitas model protein pada plot Ramachandran dapat diketahui berdasarkan keberadaan *outlier*. *Outlier* merupakan asam amino yang sudut torsinya tidak sesuai dengan plot Ramachandran yang mana residu tersebut diduga kuat memiliki geometri yang salah. Pada umumnya, semakin banyak *outlier* maka model yang dihasilkan memiliki kualitas yang rendah.



2Y9X *Z-score*: -8,45

*Tyr*Ao BLAST *Z-score*: -4,58

*Tyr*Ao MOE *Z-score*: -3,54

*Tyr*Ao SAS *Z-score*: -3,64

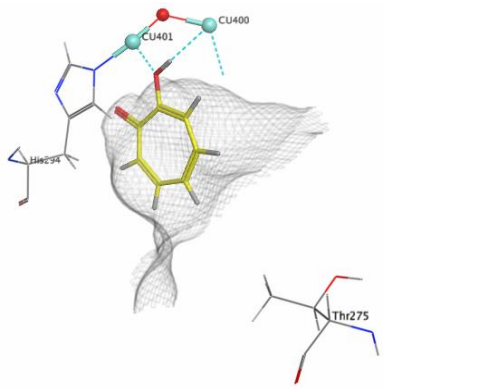
Gambar 1. Plot energi residu dan *Z-score* model *Tyr*Ao berdasarkan ProSA

Struktur 3D suatu protein terdiri dari *conserve region* dan *variable region. Conserve region* adalah bagian dari protein yang terdiri dari *helix* dan *sheet* penyusun fungsi protein yang merupakan bagian rigid dari protein, sedangkan *variable region* merupakan bagian dari protein yang memiliki fleksibilitas tinggi. Daerah ini biasanya disusun oleh *coil* dan *turn*. Adanya *outlier* pada *conserve region* akan menurunkan kualitas protein secara drastis. Hal ini disebabkan karena *conserve region* adalah bagian yang rigid sehingga kesalahan geometri pada bagian ini dapat berakibat pada perubahan struktur dan fungsi protein. Namun adanya *outlier* pada *variable region* dapat diabaikan berdasarkan asumsi bahwa *variable region* merupakan bagian yang kurang berkontribusi secara langsung pada struktur dan fungsi protein. Selain itu, *variable region* merupakan bagian yang bersifat fleksibel sedangkan pemodelan homologi merupakan model rigid dari suatu protein yang tidak menyajikan fitur fleksibilitas dari protein. Pemodelan homologi tidak dapat memodelkan bagian fleksibel dari protein secara keseluruhan sehingga akan ada kecenderungan terjadinya *outlier* pada *variable region* yang bersifat fleksibel.

Berdasarkan pada hasil evaluasi dengan menggunakan ProSA (Gambar 1) dapat diketahui bahwa model *Tyr*Ao BLAST memiliki *Z-score* paling rendah diantara ketiga model. Selain itu, plot energi residu *Tyr*Ao BLAST juga memiliki kondisi yang paling sesuai karena nilainya cenderung lebih rendah dibandingkan 2 model yang lain. Evaluasi ProSA juga dilakukan terhadap *template* 2Y9X untuk mengetahui kesesuaian antara model dengan *template*. *Template* 2Y9X memiliki *Z-score* -8,45 yang lebih rendah dibanding model *Tyr*Ao BLAST yaitu -4,58.

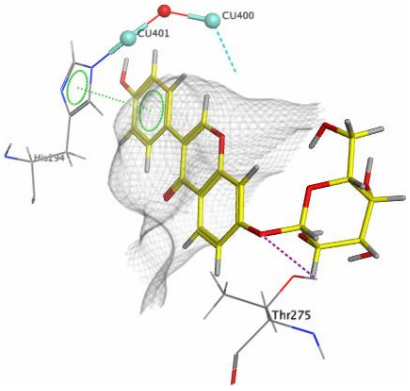
Docking dilakukan pada sisi aktif enzim tirosinase yang mana terdapat 2 atom Cu^{2+} pada *cavity*-nya. Luaran dari *docking* molekuler berupa *pose* dan *score*. *Pose* merupakan posisi dan konformasi ligan pada sisi aktif model *Tyr*Ao. *Pose* akan menentukan interaksi ligan dengan residu-residu asam amino model *Tyr*Ao di sekitarnya. *Score* biasanya dinyatakan sebagai *energy based score* yang mana semakin rendah nilainya

menandakan semakin stabil interaksi ligan-resptor sehingga afinitas ligan terhadap reseptor semakin kuat.



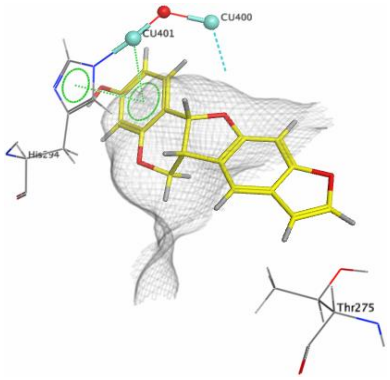
Gambar 2. Interaksi *ligand native* (tropolon) dengan residu-residu pada *active site* secara 3D.

Tropolon merupakan *native ligand* yang berada pada struktur 3D *template* dan dimodelkan pada sisi aktif model *Tyr*Ao. Interaksi tropolon dengan Cu pada sisi aktif (Gambar 2) merupakan mekanisme penuntun interaksi senyawa-senyawa antitirosinase lainnya. Interaksi tropolon dengan Cu menjadi dasar pemberlakuan *constraint* dengan memberikan nilai lebih pada pose senyawa-senyawa aktif pada bengkoang yang berinteraksi dengan Cu. Adanya pemberlakuan *constraint* pada *scoring function* diharapkan dapat menuntun arah eksplorasi *pose* dengan lebih baik.



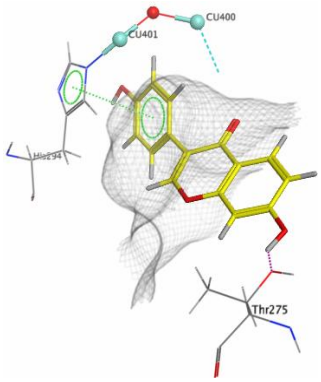
Gambar 3. Interaksi senyawa A1 dengan residu-residu pada *active site* secara 3D

Senyawa A1 berinteraksi dengan residu-residu pada *active site*, yaitu dengan residu Thr275 dan residu His294 (Gambar 3). Senyawa A1 berinteraksi dengan residu Thr275 secara ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen yang terjadi dibentuk oleh atom oksigen (O) pada senyawa A1 yang memiliki muatan parsial negatif dengan atom hidrogen (H) pada residu Thr275 yang memiliki muatan parsial positif. Interaksi yang terjadi antara senyawa A1 dengan residu His294 adalah interaksi hidrofobik. Interaksi terjadi antara cincin aromatik pada senyawa A1 dengan cincin pada residu His294 yang keduanya bersifat hidrofobik.



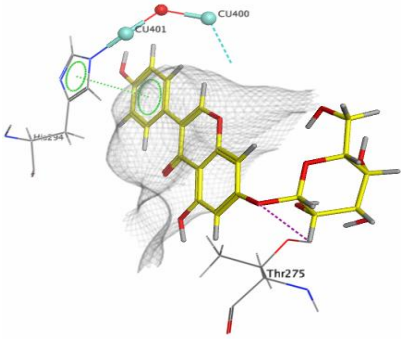
Gambar 4. Interaksi senyawa A2 dengan residu-residu pada *active site* secara 3D

Senyawa A2 berinteraksi dengan residu His294 dan Cu401 (Gambar 4). Interaksi yang terjadi antara senyawa A2 dengan residu His294 adalah interaksi hidrofobik melalui cincin aromatik pada senyawa A2 dengan cincin pada residu His294. Selain berinteraksi secara hidrofobik, cincin aromatik senyawa A2 memiliki elektron phi yang mampu mengikat atom elektropositif secara ionik seperti Cu.



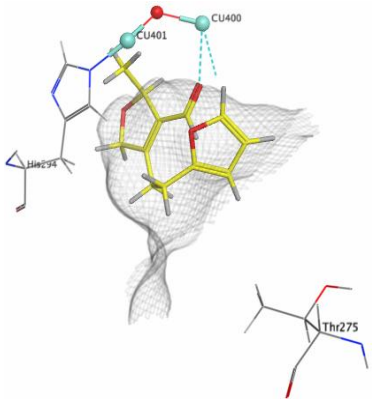
Gambar 5. Interaksi senyawa A3 dengan residu-residu pada *active site* secara 3D

Pada sisi aktif model, senyawa A3 berinteraksi dengan residu Thr275 dan residu His294 (Gambar 5). Senyawa ini berinteraksi dengan residu Thr275 secara ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen yang dibentuk adalah antara atom H pada senyawa A3 dengan atom O pada residu Thr275. Interaksi senyawa A3 dengan residu His294 adalah secara interaksi hidrofobik pada cincin aromatik senyawa A3 dengan cincin pada residu His294.



Gambar 6. Interaksi senyawa A4 dengan residu-residu pada *active site* secara 3D

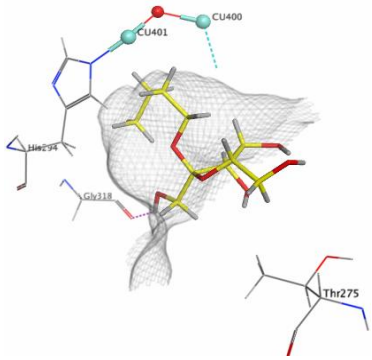
Senyawa A4 berinteraksi pada sisi aktif model dengan mengadakan ikatan hidrogen dengan residu Thr275 dan berinteraksi secara hidrofobik dengan residu His294 (Gambar 6). Ikatan hidrogen terbentuk antara atom O pada senyawa A4 dengan atom H pada residu Thr275. Interaksi hidrofobik terjadi antara cincin aromatik senyawa A4 dengan cincin pada residu His294.



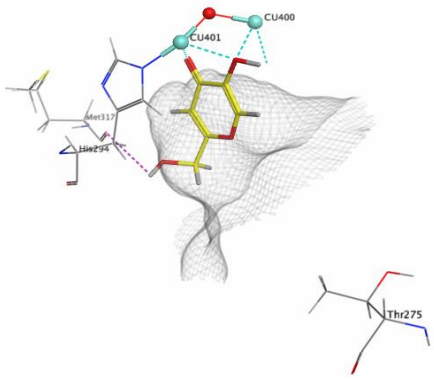
Gambar 7. Interaksi senyawa A5 dengan residu-residu pada *active site* secara 3D

Senyawa A5 berinteraksi pada sisi aktif model *Tyr*Ao dengan mengikat Cu secara ikatan logam (Gambar 7). Ikatan logam terjadi antara atom O pada senyawa A5 dengan atom Cu. Senyawa A5 mampu berinteraksi dengan mengikat Cu karena mempunyai struktur yang cukup fleksibel. Struktur yang fleksibel dari senyawa A5 memungkinkan senyawa tersebut untuk dapat membentuk konformasi yang mempunyai fitur mirip dengan *native ligand* sehingga mampu berinteraksi dengan atom Cu dengan mengadakan ikatan logam.

Senyawa A6 berinteraksi dengan mengadakan ikatan hidrogen dengan residu Gly318 pada sisi aktif model (Gambar 8). Senyawa aktif A6 memiliki sebuah rantai siklik tetapi tidak mempunyai gugus aromatik. Walaupun senyawa A6 memiliki rantai siklik namun rantai siklik tersebut dipenuhi oleh gugus-gugus hidroksi yang bersifat elektronegatif. Akibatnya interaksi hidrofobik senyawa A6 dengan residu His294 tidak bisa terjadi.



Gambar 8. Interaksi senyawa aktif A6 dengan residu-residu pada *actve site* secara 3D



Gambar 9. Interaksi senyawa aktif A7 dengan residu-residu pada *actve site*

Senyawa A7 adalah *kojic acid* yang merupakan kontrol positif senyawa antitirosinase seperti halnya tropolon. *Kojic acid* memiliki struktur mirip dengan ligan *native* tropolon sehingga menghasilkan interaksi yang seragam dengan tropolon, yaitu mengikat Cu. Selain mengikat Cu, senyawa A7 juga mengadakan interaksi ikatan hidrogen dengan residu Met317 (Gambar 9).

Berdasarkan evaluasi interaksi senyawa-senyawa yang ditambatkan terhadap model *Tyr*Ao (Tabel III), residu Thr275 dan His294 merupakan residu yang paling banyak memiliki interaksi dengan senyawa-senyawa aktif bengkoang. Residu-residu tersebut diduga merupakan *key residue* dalam reaksi penghambatan enzim tirosinase oleh senyawa-senyawa aktif bengkoang. Dengan diketahuinya *key residue* pada enzim tirosinase diharapkan dapat menuntun arah perancangan *whitening agent* yang lebih poten

dengan mempertimbangkan fitur-fitur yang dimiliki residu-residu tersebut. Residu Thr275 cenderung memiliki interaksi ikatan hidrogen, residu His294 cenderung memiliki interaksi hidrofobik. Senyawa ligan *native* dan A7 yang merupakan kontrol positif mempunyai interaksi dengan mengikat logam Cu. Interaksi logam juga diprediksi memiliki peran yang penting dalam penghambatan enzim tirosinase.

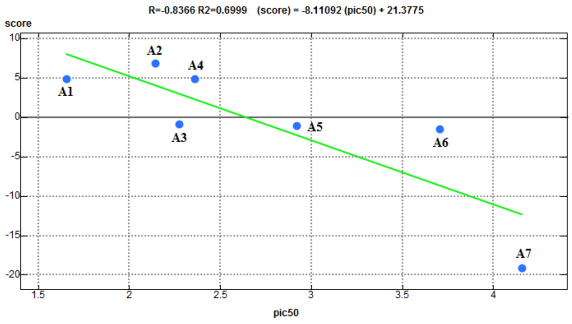
Tabel III. Interaksi senyawa-senyawa aktif bengkoang pada sisi aktif model *Tyr*Ao

Senyawa	Interaksi
Tropolon	Cu400: ikatan logam Cu401: ikatan logam
A1	Thr275: ikatan hidrogen His294: interaksi hidrofobik
A2	His294: interaksi hidrofobik Cu401: ikatan logam
A3	Thr275: ikatan hidrogen His294: interaksi hidrofobik
A4	Thr275: ikatan hidrogen His294: interaksi hidrofobik
A5	Cu400: ikatan logam
A6	Gly318: ikatan hidrogen Met317: ikatan hidrogen
A7	Cu400: ikatan logam Cu401: ikatan logam

Tabel IV. Daftar pIC_{50} dan *score* dari *pose* terpilih senyawa-senyawa aktif bengkoang

Senyawa	pIC_{50}	*Score*
A1	1,6536	4,8208
A2	2,1433	6,8102
A3	2,2716	-0,8755
A4	2,3580	4,8518
A5	2,9172	-1,0488
A6	3,7033	-1,5572
A7	4,1550	-19,1050

Selain menganalisis interaksi senyawa-senyawa aktif bengkoang, dilihat pula *score* dari *pose* yang terpilih. *Score* yang didapat kemudian dikorelasikan dengan hasil uji *in vitro* yang dilakukan Lukitaningsih (2009) untuk mengetahui korelasi penelitian *in silico* dan *in vitro* yang dilakukan. Korelasi yang dibuat adalah plot pIC_{50} senyawa-senyawa aktif bengkoang secara *in vitro* terhadap *score* dari *pose* hasil *docking* yang terpilih (Tabel VI).



Gambar 10. Plot pIC_{50} *versus docking score*

Plot antara pIC_{50} dengan *score* (Gambar 10) dibuat dengan metode regresi linear. Plot ini menunjukkan korelasi antara hasil penelitian *in vitro* dengan hasil *docking*. Berdasarkan plot pIC_{50} dengan *score* dapat diketahui bahwa korelasi yang dihasilkan yaitu -0,8366 yang merupakan korelasi yang baik (Buda and Jarynowski, 2010; Miller and Miller, 2010). Plot tersebut memiliki nilai koefisien determinasi sebesar 0,6999 yang berarti *score* ditentukan oleh pIC_{50} sebesar 69,99 %. Hal tersebut menandakan bahwa penelitian secara *in silico* memberikan korelasi yang baik dan sesuai dengan penelitian *in vitro* yang telah dilakukan sebelumnya. Dengan demikian, baik penelitian *in vitro* maupun *in silico* yang dilakukan untuk menguji aktivitas antitirosinase suatu senyawa pada *Aspergillus oryzae* akan memiliki hasil serupa.

KESIMPULAN

Model enzim *Tyr*Ao terbaik yang dihasilkan merupakan model enzim *Tyr*Ao BLAST. Senyawa-senyawa aktif pada bengkoang diprediksi berinteraksi dengan residu Thr275 secara ikatan hidrogen dan residu His294 secara interaksi hidrofobik aromatik. Penelitian *in silico* dan *in vitro* senyawa-senyawa aktif bengkoang dalam menghambat tirosinase memiliki korelasi (R^2) sebesar -0,8366.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmed, A., Kazemi, S., Gohlke, H., 2007, Protein Flexibility and Mobility in Structure-Based Drug Design, *Disertation*, Frankfurt Germany, JW Goethe-University.

Anonim, 2010, *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia*, Nomor Hk.03.1.23.12.10.12123, Jakarta, hal 2-9

Anonim, 2011, Tyrosine Biosynthetic Pathway, http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway_map00350.

Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, T., Taukamoto, K., Hearing, V.J., 1993, Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation*, J. Bio. Chem*., 268(34): 25650-5.

Buda. A., and Jarynowski, A., 2010, Life-time of correlations and its applications, vol.1. Wydawnictwo Niezalezne: 5–21, Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Pearson_correlation_coefficient.

Claverie, J. and Notredame, C., 2006, *Bioinformatic for Dummies*, 2nd edition, Wiley Publishing Inc., Indiana.

Drenth, J., 2007, *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer Science+Business Media LLC, New York.

Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J., Weijn, A., Mes, J.J., Fusetti, F., Wichers, H.J., Dijkstra, B.W., 2011, Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone, ACS publications, *Biochemistry*, 50: 5477-5486.

Lukitaningsih ,E., 2009, The exploration of whitening and sun screening compounds in bengkoang roots (*Pachyrhizus erosus*), Disertation, Würzburg Deutsch, Julius-Maximillians-Universität..

Miller, J.N., and Miller, J.C., 2010, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th ed., Pearson Education Limited, U.K. London.

Sánchez, R., Šali, A., 2000, Comparative Protein Structure Modeling–Introduction and Practical Examples with Modeller, dalam Webster DM. (Ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 143: Protein Structure Prediction–Methods and Protocol. 97-129. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Sippl, M.J., 1993, Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins, *Proteins*, 17: 355-362.

Svensson, C.K., Cowen, E.W., Gaspari, A.A., 2000, Cutaneus Drug Reactions, *Pharmacol Rev,* 53:357-79.

Wiederstein, M. and Sippl, M.J., 2007, ProSa-Web: Interactive Web Service for The Recognition of Errors In The Three-Dimensional Structures of Protein*, Nucleic Acids Res*, 35:407-410.

Wisnusaputra, A., 2012, Skrining In Silico Senyawa Aktif yang Terkandung dalam Bengkoang (*Pachyrrhizus erosus*) sebagai Antitirosinase pada *Aspergillus Oryzae*: Studi Komputasional dengan *Homology Modeling* dan *Molecular Docking, Skripsi,* Jogjakarta, Fakultas Farmasi UGM.