

## Prediksi Aktivitas Senyawa Turunan Terpenoid dari Tanaman Wortel (*Daucus carota*) sebagai Kandidat Antimelanogenesis secara *In Silico*

Shela Salsabila, Susanti Susanti, Richa Mardianingrum\*  
Program Studi Farmasi, Universitas Perjuangan, Tasikmalaya, Indonesia

\*Corresponding author: [richamardianingrum@unper.ac.id](mailto:richamardianingrum@unper.ac.id)

### Abstract.

The increased of melanin biosynthesis (melanogenesis) process can cause skin disorders such as hyperpigmentation. One of the targets in the development of antimelanogenesis is the tyrosinase enzyme which acts as a catalyst for the oxidation of L-tyrosine to dihydroxyphenylalanine (DOPA) which later forms melanin. Previous studies reported that carrot extract (*Daucus carota*) showed a potential tyrosinase inhibitor activity, but the specific potential compounds are not yet known. The objective of this research is to study the interaction of terpenoid derived compounds from carrot (*Daucus carota*) against the tyrosinase enzyme receptor (PDB ID: 5I38). The research was conducted *in silico* through prediction studies of toxicity and pharmacokinetic, screening of ligand based drug likeness (drug scan), docking and molecular dynamics simulation. The docking results showed that the best compound with the lowest binding energy compared to other test compounds was terpinolene with a value of -5.83 kcal/mol and  $K_i$  53.61  $\mu$ M, which has been predicted to meet the standards of toxicity, pharmacokinetics and drug scan. These results was proven by molecular dynamics simulation for 20 ns using the MM-GBSA method with  $\Delta G_{TOTAL}$  value of -7.4879 kcal/mol and the amino acids that play a role in this interaction are the amino acids His208 and Arg209. In terms of toxicity and pharmacokinetics, terpinolene compounds are better than natural ligands. Terpinolene compound is predicted to be used as an antimelanogenesis candidate.

**Keywords:** Antimelanogenesis, Carrots, *In Silico*, Terpenoids, Tyrosinase Inhibitor.

### Abstrak

Proses biosintesis melanin (melanogenesis) yang meningkat dapat menyebabkan kelainan kulit seperti hiperpigmentasi. Salah satu target dalam pengembangan antimelanogenesis adalah enzim tirosinase yang berperan sebagai katalisator proses oksidasi L-tirosin menjadi dihydroxyphenylalanine (DOPA) yang kemudian membentuk melanin. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak wortel (*Daucus carota*) menunjukkan aktivitas inhibitor tirosinase yang kuat, namun spesifik senyawa yang berpotensi belum diketahui. Tujuan dilakukan penelitian ini untuk mempelajari interaksi senyawa turunan terpenoid dari tanaman wortel (*Daucus carota*) terhadap reseptor enzim tirosinase (PDB ID: 5I38). Penelitian dilakukan secara *in silico* melalui studi prediksi toksisitas dan farmakokinetika, *screening ligand based drug likeness (drug scan)*, *docking* serta simulasi dinamika molekul. Hasil *docking* menunjukkan bahwa senyawa terbaik dengan *binding energy* paling rendah dibandingkan senyawa uji lainnya yaitu senyawa terpinolene dengan nilai  $\Delta G$  -5,83 kkal/mol dan  $K_i$  53,61  $\mu$ M, setelah sebelumnya diprediksi memenuhi standar toksisitas, farmakokinetika, dan drug scan. Hasil docking tersebut dibuktikan dengan simulasi dinamika molekul selama 20 ns menggunakan metode MM-GBSA dengan  $\Delta G_{TOTAL}$  bernilai -7,4879 kkal/mol dan berinteraksi dengan sisi aktif reseptor enzim tirosinase yaitu asam amino His208 dan Arg209. Dalam aspek toksisitas dan farmakokinetika, senyawa terpinolene lebih baik dibandingkan *kojic acid*. Senyawa terpinolene diprediksi dapat digunakan sebagai kandidat antimelanogenesis.

**Kata Kunci:** Antimelanogenesis, *In Silico*, Inhibitor Tirosinase, Terpenoid, Wortel

### PENDAHULUAN

Kelainan pigmentasi pada kulit ditandai dengan perubahan warna cokelat muda pada kulit dengan diameter yang beragam serta penyakit yang berkaitan dengan pigmentasi kulit diantaranya hiperpigmentasi dan

melasma (Tabri & Angreni, 2016). Hiperpigmentasi merupakan kelainan kulit yang terjadi karena meningkatnya proses melanogenesis yang terjadi pada melanosit sehingga menyebabkan sebagian atau seluruh area kulit menjadi gelap (Laksmiani &

Nugraha, 2019). Melanin merupakan pigmen gelap yang dihasilkan melalui proses melanogenesis, dimana tirosin diubah oleh enzim tirosinase menjadi L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), *dopaquinone*, *dopachrome* sehingga membentuk melanin. Pigmen-pigmen tersebut kemudian ditransferkan menuju keratinosit sehingga akan terakumulasi di dalam lapisan epidermis kulit dan menyebabkan hiperpigmentasi bahkan kanker kulit (Oh *et al.*, 2018).

Tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam mengontrol proses melanogenesis sebagai katalisator proses oksidasi L-tirosin menjadi *dihydroxyphenylalanine* (DOPA) yang nantinya membentuk melanin. Tirosinase telah menjadi target yang paling umum digunakan sebagai reseptor agen terapeutik antimelanogenesis (Allgisna *et al.*, 2021).

Wortel (*Daucus carota*) merupakan salah satu tanaman biennial (siklus hidup 2 tahunan) yang termasuk dalam famili *apiaceae* dengan ketersediaan hayati yang melimpah serta kaya akan nutrisi dan senyawa metabolit sekunder seperti antosianin, fenolik, serta terpenoid yang dapat berkontribusi sebagai zat bioaktif yang mempengaruhi fisiologi dan kesehatan manusia. Berdasarkan penelitian Jdey *et al.* (2017), ekstrak wortel (*Daucus carota*) menunjukkan aktivitas antioksidan yang dinyatakan baik dengan nilai  $IC_{50} = 37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  melalui pengujian metode DPPH dengan *butylated hydroxytoluene* (BHT) sebagai kontrol positif, serta menunjukkan aktivitas inhibitor tirosinase yang kuat dengan  $IC_{50} = 120.07 \pm 0.19a \mu\text{g.mL}^{-1}$  mendekati  $IC_{50}$  dari *kojic acid* ( $52.01 \pm 1.98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Terdapatnya aktivitas penghambatan tirosinase pada ekstrak wortel (*Daucus carota*) pada penelitian sebelumnya, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa metabolit sekunder spesifik yang dapat berperan dalam aktivitas inhibitor tirosinase, salah satunya senyawa turunan terpenoid. Berdasarkan penelitian Zolghadri *et al.* (2019) senyawa terpenoid ini berkontribusi dalam aktivitas inhibitor tirosinase sebagai agen antimelanogenesis, salah satunya pada

senyawa monoterpen turunan carvacrol seperti *2-[2-metil-5-(propan-2-il)fenoksi]-2oksoetil(2E)-3-(2,4-dihidroksifenil)prop-2-enoat* yang telah menunjukkan aktivitas penghambatan tirosinase yang baik dengan nilai  $K_i$  0,05  $\mu\text{M}$  dan  $IC_{50} = 0,0167 \mu\text{M}$ .

Senyawa turunan terpenoid yang terkandung dalam wortel (*Daucus carota*) diperlukan prediksi aktivitasnya dalam penghambatan tirosinase terhadap target spesifik reseptor tirosinase menggunakan metode komputasi sebagai upaya pengembangan senyawa antimelanogenesis. Metode komputasi ini dapat memprediksi kemungkinan interaksi yang terjadi antara ligan uji dan reseptor protein target sehingga dapat dipelajari mekanisme kerjanya (Kusuma & Hadi, 2019). Studi *docking* ini mempelajari beberapa struktur molekul yang berikatan satu sama lain secara 3 dimensi. Penambatan ligan dan protein ini bertujuan untuk mempelajari dan memprediksi pendekatan molekul serta menemukan kemungkinan konformasi dan afinitas pengikatan antar keduanya (Prasetio *et al.*, 2021).

Berdasarkan uraian latar belakang, peneliti bermaksud untuk memprediksi aktivitas penghambatan tirosinase senyawa turunan terpenoid dari tanaman wortel (*Daucus carota*) terhadap reseptor tirosinase yang spesifik sebagai kandidat antimelanogenesis secara pendekatan *in silico*.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Struktur 37 senyawa uji turunan terpenoid dari wortel (*Daucus carota*) (Ahmad *et al.*, 2019; Keilwagen *et al.*, 2017) diunduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Reseptor enzim tirosinase diunduh melalui <http://www.rcsb.org/pdb/> dengan kode PDB 5I38 (Deri *et al.*, 2016).

### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain perangkat keras komputer dengan spesifikasi *Intel® Core™ i5-6400 CPU @ 3.90 GHz (4CPUs)*, *Nvidia Geforce GTX 970 Gigabyte OC Edition GPU*, *8GB DDR4 RAM*.

Perangkat lunak yang digunakan yaitu *Marvin Sketch*, *Molegro Molecular Viewer*, *AutoDockTools 1.5.6*, *Discovery Studio Visualizer*, *AMBER 16*, *ProTox*, *AdmetLab* dan *Lipinski's Rules of Five*.

## Metode

### Prediksi Toksisitas, Farmakokinetika dan *Lipinski's Rules of Five*

Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan perangkat lunak *ProTox II* (<https://toxnew.charite.de/>). Prediksi farmakokinetik dilakukan menggunakan perangkat lunak *AdmetLab* (<https://admet.scbdd.com/>) untuk menghasilkan parameter penyerapan dan distribusi, dan menggunakan perangkat lunak *pkCSM* (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) untuk memprediksi parameter metabolisme dan ekskresi. Prediksi *Lipinski's Rules of Five* dilakukan melalui perangkat lunak <http://www.scfbioitd.res.in/software/drugdesig/lipinski.jsp>.

### Preparasi Ligan dan Reseptor

Struktur 3D enzim tirosinase diunduh dari Protein Data Bank (PDB ID: 5I38) (Deri *et al.*, 2016) dan analisis *ramachandran plot* pada *webserver* <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>. 37 struktur senyawa turunan terpenoid dioptimasi menggunakan perangkat lunak *MarvinSketch 5.2.5.1* (Mardianingrum *et al.*, 2021).

### Validasi Metode Docking

Metode divalidasi dengan melakukan re-docking ligan alami ke situs aktif reseptor dengan menyesuaikan ukuran dan nilai yang diperoleh adalah *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dalam angstrom (Å). Validasi metode molecular docking valid jika diperoleh nilai  $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$  (Mardianingrum *et al.*, 2021).

### Docking Senyawa Uji

Docking senyawa uji dilakukan terhadap reseptor target menggunakan program *AutodockTools* dengan Parameter *docking* diatur menggunakan *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) dengan jumlah runs 100 kali, ukuran populasi 150, energi evaluasi 250.000, laju mutasi gen 0,02, dan laju *crossover* 0,8 dan hasil simulasi penambatan molekul

dikluster dengan menggunakan toleransi RMSD 1.0 Å. Hasil pada tahap ini berupa nilai energi bebas atau  $\Delta G$  dengan satuan kkal/mol dan nilai konstanta penghambatan (Ki) (Dermawan *et al.*, 2019).

## Visualisasi

Interaksi ligan dan reseptor berupa ikatan yang terbentuk secara 2D dan 3D dapat dilihat melalui visualisasi hasil docking pada perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* (Ratu *et al.*, 2021).

## Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul dilakukan pada senyawa terbaik hasil *docking* dan ligan alami (*kojic acid*) menggunakan program *AMBER 16*. Proses ini meliputi preparasi ligan dengan minimasi melalui kalkulasi kuantum semi empiris AM1-BCC dan penambahan medan gaya ff14SB, preparasi reseptor dengan menambahkan medan gaya ff14SB dan memperbaiki parameter rantai protein melalui model *LeaP*, preparasi kompleks dengan menetralkan sistem dan menambahkan molekul air *TIP3P* pada tahap solvasi, minimisasi sistem melalui 3 tahapan, *heating* dengan suhu 0-310 K secara bertahap, ekuilibrisasi melalui 6 tahapan dan proses produksi selama 20 ns. Selanjutnya dilakukan analisis RMSD, RMSF dan MM-GBSA (Dermawan *et al.*, 2019).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Prediksi Toksisitas

Prediksi toksisitas dilakukan pada 37 senyawa uji menggunakan program *ProTox II* dengan parameter Karsinogenisitas, Mutagenisitas, dan Sensitisasi Kulit. dapat dilihat pada Tabel 1.

*Mutagenicity* digunakan untuk memprediksi mutasi terbalik bakteri jangka pendek dalam mendeteksi senyawa potensial yang dapat menyebabkan kerusakan genetik (Xu *et al.*, 2012). Prediksi karsinogenisitas dilakukan untuk memprediksi senyawa yang berpotensi menyebabkan perkembangan kanker (Golbamaki & Benfenati, 2016). Prediksi *skinsensitizer* atau sensitivitas kulit digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa

yang dapat memberikan reaksi alergi seperti ruam, lepuh atau gatal-gatal bila kontak langsung dengan kulit (Ta *et al.*, 2021).

Berdasarkan Tabel 1, dari 37 senyawa uji, 10 senyawa uji (sabinene,  $\beta$ -pinene, limonene, terpinolene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -caryophyllene, gemacrene D,  $\alpha$ -farnesene,  $\beta$ -

bisabolone) diprediksi memiliki tingkat toksisitas yang lebih baik dibandingkan kojic acid. Senyawa uji tersebut kemudian dilanjutkan pada kajian aspek farmakokinetik untuk memprediksi parameter ADME (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi).

**Tabel 1.** Hasil prediksi toksisitas

No.	Nama Senyawa	Parameter Toksisitas		
		Carcinogenicity	Mutagenicity	Skinsen
1	<i>kojic acid</i>	+	+	-
2	<i><math>\alpha</math>-thujene</i>	-	-	+
3	<i><math>\alpha</math>-pinene</i>	-	-	+
4	<i>sabinene</i>	-	-	-
5	<i><math>\beta</math>-pinene</i>	-	-	-
6	<i><math>\beta</math>-myrcene</i>	-	-	+
7	<i><math>\alpha</math>-phellandrene</i>	-	-	+
8	<i><i>o</i>-cymene</i>	+	-	+
9	<i>limonene</i>	-	-	-
10	<i>ocimene</i>	-	-	+
11	<i><math>\gamma</math>-terpinene</i>	-	-	+
12	<i>terpinolene</i>	-	-	-
13	<i>linalool</i>	-	-	+
14	<i>borneol</i>	-	-	+
15	<i>terpinen-4-ol</i>	-	-	+
16	<i><math>\alpha</math>-terpineol</i>	-	-	+
17	<i><math>\beta</math>-cyclocitral</i>	-	-	+
18	<i>bornyl acetate</i>	-	-	+
19	<i>geranylacetone</i>	-	-	+
20	<i>linalyl isovalerate</i>	-	-	+
21	<i><math>\delta</math>-elemene</i>	-	-	+
22	<i><math>\alpha</math>-cubenene</i>	-	-	+
23	<i><math>\alpha</math>-longipinene</i>	-	-	+
24	<i><math>\beta</math>-caryophyllene</i>	-	-	-
25	<i><math>\beta</math>-farnesene</i>	-	-	-
26	<i><math>\alpha</math>-caryophyllene</i>	-	-	-
27	<i>gemacrene D</i>	-	-	-
28	<i><math>\alpha</math>-farnesene</i>	-	-	-
29	<i><math>\alpha</math>-bisabolone</i>	-	-	+
30	<i><math>\beta</math>-bisabolone</i>	-	-	-
31	<i>caryophyllene oxide</i>	-	-	+
32	<i><math>\alpha</math>-bisabolol</i>	-	-	+
33	<i><math>\alpha</math>-carotene</i>	-	+	+
34	<i><math>\beta</math>-carotene</i>	-	+	+
35	<i>lutein</i>	-	-	+
36	<i>lycopene</i>	-	-	+
37	<i>zeaxanthin</i>	-	-	+
38	<i><math>\beta</math>-cryptoxanthin</i>	-	-	+

**Prediksi Farmakokinetika**

Prediksi farmakokinetika dilakukan terhadap 10 senyawa uji menggunakan program *AdmetLab* dengan parameter absorpsi dan distribusi, dan menggunakan program *pkCSM* untuk memprediksi parameter metabolisme dan ekskresi, dapat dilihat pada Tabel 2.

Dalam proses absorpsi, suatu sediaan obat oral harus dapat melewati membran sel usus, sehingga parameter *Caco-2 permeability* yang merupakan sel adenokarsinoma usus manusia dapat digunakan sebagai pendekatan dalam memprediksi permeabilitas suatu senyawa. , dengan interpretasi hasil permeabilitas tinggi memiliki nilai  $>-5,15\log$  cm/s (Xiong *et al.*, 2021).

Parameter *Human Intestinal Absorption* (HIA) memprediksi penyerapan sediaan obat oral oleh usus yang dapat digunakan sebagai indikator bioavailabilitas obat oral sampai batas tertentu. Klasifikasi absorpsi yang baik harus  $>30\%$ , jika  $<30\%$  diprediksi senyawa tersebut tidak akan dapat diserap oleh usus (Xiong *et al.*, 2021).

Parameter *Plasma Protein Binding* (PPB) memprediksi distribusi obat dalam tubuh

dengan melihat kemampuan obat mengikat protein plasma. PPB ini berhubungan langsung dengan bioavailabilitas, karena konsentrasi obat yang terikat pada protein plasma akan menjadi tidak aktif. Suatu senyawa diprediksi memiliki PPB yang baik jika  $<90\%$  (Xiong *et al.*, 2021).

Penghambatan enzim sitokrom P450 (CYP) akan menyebabkan akumulasi plasma toksik senyawa inhibitor enzim CYP yang mengubah metabolismenya sendiri pada dosis tinggi. Prediksi ini diperlukan untuk mengurangi interaksi obat yang tidak dapat dihindari. Sitokrom yang paling banyak diekspresikan dan bertanggung jawab untuk biotransformasi di hati adalah CYP3A4 dan CYP2D6, sitokrom ini fleksibel dan mampu mengikat berbagai substrat dengan interaksi pengikatan tinggi (Beck *et al.*, 2021).

Prediksi ekskresi dilakukan dengan parameter Clearance (CL/clearance) yang berhubungan dengan berat molekul dan hidrofilitas senyawa. Interpretasi dari klirens yang diprediksi adalah memiliki klirens yang tinggi jika nilainya  $>15$  mL/menit/kg; memiliki izin sedang jika nilainya 5-15 mL/menit/kg; dan memiliki klirens yang rendah jika  $<5$  mL/menit/kg (Xiong *et al.*, 2021).

**Tabel 2.** Hasil prediksi farmakokinetika

No.	Nama Senyawa	Parameter Farmakokinetika					
		Caco2	HIA	PPB (%)	CYP3A4 substrate	CYP2D6 inhibitor	CL (mL /menit /kg)
1	<i>kojic acid</i>	-5,00	$<30\%$	28,83	-	-	9,06
2	<i>sabinene</i>	-4,32	$\geq 30\%$	68,92	-	-	11,19
3	$\beta$ - <i>pinene</i>	-4,33	$\geq 30\%$	68,93	-	-	10,09
4	<i>limonene</i>	-4,33	$\geq 30\%$	75,29	-	-	11,51
5	<i>terpinolene</i>	-4,23	$\geq 30\%$	75,24	-	-	14,74
6	$\beta$ - <i>caryophyllene</i>	-4,45	$\geq 30\%$	76,06	-	-	6,76
7	$\beta$ - <i>farnesene</i>	-4,40	$\geq 30\%$	78,98	-	-	7,87
8	$\alpha$ - <i>caryophyllene</i>	-4,41	$\geq 30\%$	74,15	-	-	7,07
9	<i>gemacrene D</i>	-4,46	$\geq 30\%$	72,47	-	-	9,94
10	$\alpha$ - <i>farnesene</i>	-4,41	$\geq 30\%$	78,61	-	-	8,89
11	$\beta$ - <i>bisabolone</i>	-4,46	$\geq 30\%$	79,63	-	-	14,31



Berdasarkan Tabel 2, 10 senyawa yang diuji (*sabinene*,  $\beta$ -*pinene*, *limonene*, *terpinolene*,  $\beta$ -*caryophyllene*,  $\beta$ -*farnesene*,  $\alpha$ -*caryophyllene*, *gemacrene D*,  $\alpha$ -*farnesene*,  $\beta$ -*bisabolone*) diprediksi memiliki aspek farmakokinetika yang baik dibandingkan *kojic acid*. Senyawa uji kemudian dilanjutkan dalam studi *Lipinski's Rules of Five* untuk memprediksi sifat fisikokimia dan menganalisis kesamaan molekul senyawa dengan obat.

### **Lipinski's Rules of Five**

Prediksi *Lipinski's Rule of Five* dilakukan terhadap 10 ligan uji, seperti terlihat pada Tabel 3. *Lipinski's Rule of Five* digunakan untuk memprediksi kemungkinan molekul yang berpotensi menjadi obat dengan menganalisis kemiripan molekul dengan obat. Ada beberapa ketentuan untuk menentukan suatu molekul layak dijadikan obat atau tidak, antara lain massa molekul harus kurang dari 500 dalton; memiliki lipofilisitas tinggi yang ditunjukkan dengan nilai LogP kurang dari 5; kurang dari 5 donor ikatan hidrogen; kurang dari 10 akseptor ikatan hidrogen dan nilai refraksi molar harus dalam kisaran 40-130 (Lipinski, 2004).

Parameter berat molekul berkaitan dengan proses distribusi senyawa dengan interpretasi

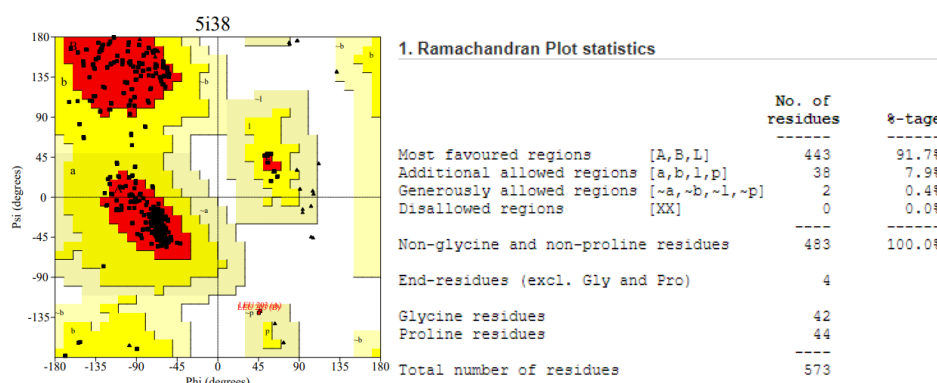
berat molekul pada nilai <500 g/mol memiliki ukuran molekul yang kecil sehingga memudahkan obat untuk menembus dan terdistribusi dalam membran biologis (Mardianingrum *et al.*, 2021).

Parameter nilai log P berkaitan dengan hidrofobisitas atau kemampuan senyawa untuk larut dalam minyak, lemak dan pelarut non-polar. Suatu senyawa dinyatakan baik sebagai obat jika memiliki sifat hidrofobik sehingga dapat menembus ke dalam lipid bilayer pada membran biologis, tetapi tidak diinginkan terlalu hidrofobik karena akan menyebabkan obat terikat terlalu lama di dalam tubuh dan menjadi racun (Mardianingrum *et al.*, 2021).

Parameter donor hidrogen dan akseptor hidrogen berkaitan dengan aktivitas biologis suatu senyawa yang mempengaruhi sifat fisikokimia seperti titik leleh, titik didih, kelarutan dalam air, kemampuan membentuk kelat dan keasaman. Sedangkan refraktori molar berkaitan dengan nilai polarisasi total molekul obat yang bergantung pada suhu, indeks bias dan tekanan (Mardianingrum *et al.*, 2021).

**Table 3.** Hasil prediksi *Lipinski's Rules of Five*

No.	Nama Senyawa	Parameter				
		Berat Molekul <500 g/mol	Donor Hidrogen <5	Akseptor Hidrogen <10	Log P <5	Refractory Molar 40-130
1	<i>kojic acid</i>	142	2	4	-0,18	32,39
2	<i>sabinene</i>	136	0	0	3,00	43,75
3	$\beta$ - <i>pinene</i>	136	0	0	3,00	43,75
4	<i>limonene</i>	136	0	0	3,31	45,91
5	<i>terpinolene</i>	136	0	0	3,45	45,98
6	$\beta$ - <i>caryophyllene</i>	204	0	0	4,73	66,74
7	$\beta$ - <i>farnesene</i>	204	0	0	5,20	70,99
8	$\alpha$ - <i>caryophyllene</i>	204	0	0	5,04	68,90
9	<i>gemacrene D</i>	204	0	0	4,89	68,83
10	$\alpha$ - <i>farnesene</i>	204	0	0	5,20	70,99
11	$\beta$ - <i>bisabolone</i>	204	0	0	5,04	68,90



Gambar 1. Gambar dan statistik Ramachandran plot reseptor 5I38

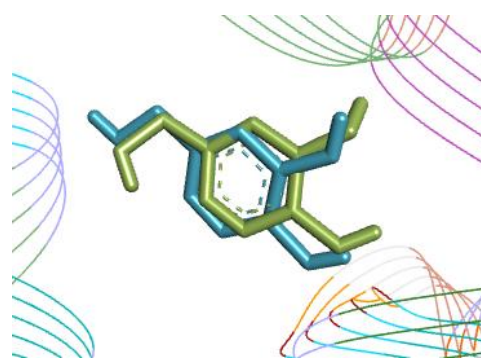
Berdasarkan Tabel 3, dari 10 senyawa yang diuji, 6 senyawa memiliki tingkat kemiripan obat yang baik dengan memenuhi aturan parameter Lipinski's Rule of Five sehingga diprediksi mampu menembus membran sel dan dapat terdistribusi dengan baik di dalam tubuh melalui penggunaan oral, sedangkan 4 senyawa uji diprediksi tidak memenuhi persyaratan standar sehingga tidak cocok sebagai kandidat obat untuk penggunaan oral, tetapi masih berpotensi menjadi kandidat obat dengan rute penggunaan lain, misalnya dengan penggunaan topikal. 10 senyawa uji (*sabinene*,  $\beta$ -*pinene*, *limonene*, *terpinolene*,  $\beta$ -*caryophyllene*,  $\beta$ -*farnesene*,  $\alpha$ -*caryophyllene*, *gamacrene D*,  $\alpha$ -*farnesene*,  $\beta$ -*bisabolone*) dilanjutkan pada tahap molecular docking untuk mengetahui aktivitasnya terhadap reseptor enzim tirosinase.

### Preparasi Ligan dan Reseptor

Struktur senyawa uji disiapkan dalam bentuk 2D, kemudian dilakukan optimasi geometri untuk mengoptimalkan bentuk geometris struktur senyawa sehingga nilai energi total sistem diminimalkan sehingga diperoleh struktur yang lebih stabil. Optimalisasi geometri ini meliputi proses protonasi pada pH 7,4 untuk menyesuaikan dengan pH cairan fisiologis tubuh manusia dan *conformational search* untuk mendapatkan energi terendah dan mendapatkan posisi molekul yang paling stabil untuk berikatan dengan sisi aktif reseptor (Ruswanto *et al.*, 2015).

Reseptor yang digunakan dengan PDB ID: 5I38 merupakan enzim tirosinase dari bakteri *Bacillus megaterium* dengan ligan alami

berupa *kojic acid* (Deri *et al.*, 2016). Reseptor ini memiliki nilai resolusi 2,60 Å, yang artinya memiliki struktur protein dengan resolusi yang tinggi karena memiliki nilai resolusi  $\geq 1$  Å dan  $\leq 3$  Å (Zardecki *et al.*, 2022). Pada analisis *Ramachandran plot*, diketahui nilai *most favoured regions* 91,7% dan *disallowed regions* 0,0%, menunjukkan bahwa struktur protein memiliki kualitas yang baik karena memiliki *most favoured regions* >90% dan *disallowed regions* <0,8% (Laskowski *et al.*, 1993). Gambar dan statistik *Ramachandran plot* reseptor 5I38 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 2. Overlay hasil re-docking konformasi ligan alami (hijau) dan struktur kristalografi (biru)

### Validasi Docking

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa hasil validasi *docking (re-docking)* reseptor enzim tirosinase terhadap ligan alami *kojic acid* dengan ukuran *grid box* 8, 12, 20 dan *number of points* x, y, z (22,827, 102,894, 49,295), diperoleh nilai RMSD sebesar 1,764. Metode *docking* dinyatakan memenuhi syarat validitas jika memiliki nilai *Root Mean Square Deviation*

(RMSD) sebesar  $\leq 2 \text{ \AA}$  (Mardianingrum *et al.*, 2021). Gambar *overlay* antara hasil *re-docking* dengan struktur kristalografi dapat dilihat pada Gambar 2.

### Docking Senyawa Uji

Molekuler *docking* senyawa uji pada reseptor enzim tirosinase dilakukan dengan melihat hasil nilai binding energy values dan konstanta inhibisi (Ki). Berdasarkan hasil *docking* pada Tabel 4, terdapat 7 senyawa yang diprediksi memiliki aktivitas lebih baik dari *kojic acid*, salah satu senyawa terbaik adalah terpinolene yang memiliki nilai energi bebas terendah sebesar -5,83 kkal/mol dengan Ki sebesar 53,61  $\mu\text{M}$ . Nilai  $\Delta G$  yang rendah membuat konformasi kompleks yang terbentuk diprediksi lebih stabil dibandingkan senyawa uji lainnya.

*Binding energy* atau energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) adalah energi yang dilepaskan ketika interaksi reseptor dan ligan membentuk ikatan. Nilai  $\Delta G$  ni dapat digunakan untuk memperkirakan afinitas pengikatan ligan pada sisi aktif reseptor, semakin rendah nilai  $\Delta G$  maka afinitas pengikatannya semakin erat

(Ruswanto *et al.*, 2015). Nilai konstanta inhibisi (Ki) berbanding lurus dengan nilai  $\Delta G$ , yang menggambarkan afinitas pengikatan dengan nilai berupa konsentrasi yang dibutuhkan suatu zat untuk mengurangi aktivitas enzim. Semakin kecil nilai Ki maka afinitas ikatan semakin besar dan semakin sedikit konsentrasi senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas enzim (Dermawan *et al.*, 2019). Sebaliknya, jika nilai  $\Delta G$  tinggi, kompleks antara ligan dan reseptor akan kurang stabil (Ruswanto *et al.*, 2022).

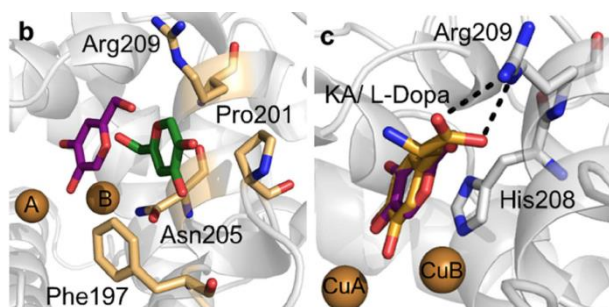
### Visualisasi

Visualisasi digunakan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi karakteristik dan sifat sisi aktif reseptor, seperti identifikasi residu asam amino yang berperan dalam struktur dan pengikatan situs aktif reseptor (Fakih & Dewi, 2021). Pengikatan pada pintu masuk sisi aktif distabilkan oleh interaksi dengan Phe197, Pro201, Asn205, dan Arg209, sehingga terjadi interaksi penting dengan sisi aktif enzim tirosinase pada heliks 11 dalam bentuk ikatan hidrofobik dengan asam amino His208 (Gambar 3) (Deri *et al.*, 2016).

**Tabel 4.** Hasil molekuler *docking* terhadap enzim tirosinase

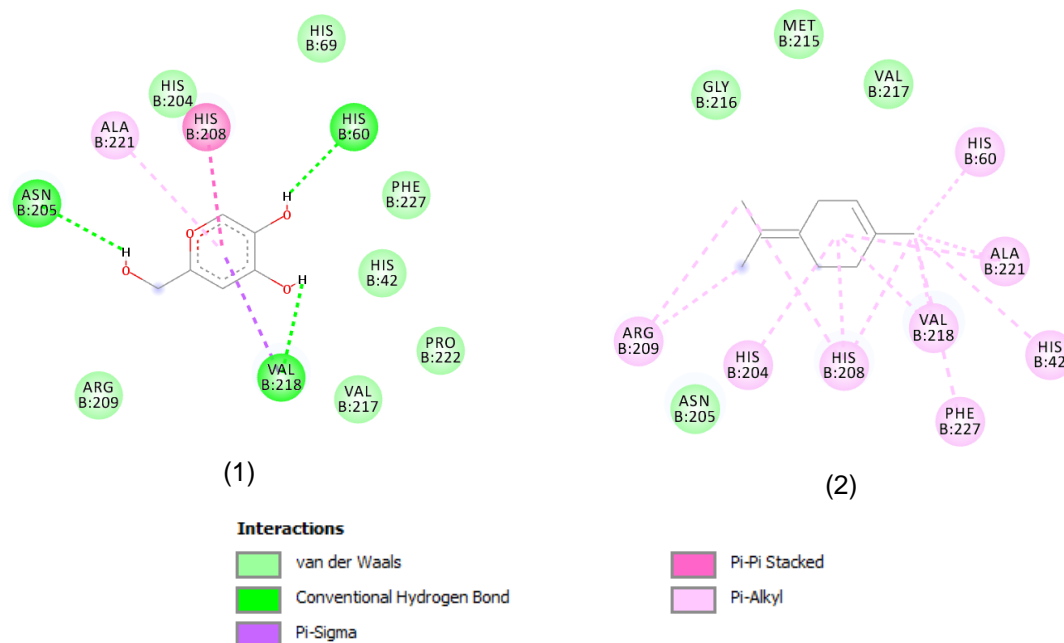
Nama Senyawa	$\Delta G$ (kkal/mol)	Ki ( $\mu\text{M}$ )	Hydrofobic Bond	Hydrogen Bond
<i>kojic acid</i>	-3,27	3.980,00	His208, Val218, Ala221	His60, Val218, Asn205
<i>sabinene</i>	-5,50	92,43	His208, His204, Arg209, Val218, Ala221, His60, His42, Phe227, His231	-
<i><math>\beta</math>-pinene</i>	-4,71	350,17	His208, His204, Arg209, Val218, Ala221	-
<i>limonene</i>	-5,71	65,05	His208, His204, Arg209, Val218, Ala221, His60, His42, Phe227, His231	-
<i>terpinolene</i>	-5,83	53,61	His208, His204, Arg209, Val218, Ala221, His60, His42, Phe227	-
<i><math>\beta</math>-caryophyllene</i>	1,46	-	-	-
<i><math>\beta</math>-farnesene</i>	-3,86	1.480,00	His208, His204, Arg209, Val218, Ala221, His60, His42, Phe227, His231	-
<i><math>\alpha</math>-caryophyllene</i>	7.760,95	-	-	-
<i>gemacrene D</i>	0,36	-	-	-
<i><math>\alpha</math>-farnesene</i>	-3,88	1.420,00	His208, His204, Ala221, His60, His42, Phe227	-
<i><math>\beta</math>-bisabolone</i>	-5,18	160,30	His208, His204, Arg209, Val218, His60, His42, Phe227, His231, Phe197	-





**Gambar 3.** Superposisi interaksi *kojic acid* dengan sisi aktif enzim tirosinase (Deri *et al.*, 2016)

Berdasarkan Tabel 4, senyawa *kojic acid* diprediksi membentuk ikatan hidrofobik dengan sisi aktif reseptor pada asam amino His208 dan Asn205. Senyawa uji yaitu *sabinene*,  $\beta$ -*pinene*, *limonene*, *terpinolene*,  $\beta$ -*farnesene*,  $\alpha$ -*farnesene* dan  $\beta$ -*bisabolone* diprediksi berinteraksi dengan sisi aktif melalui ikatan hidrofobik dengan asam amino His208 dan Arg209. Hasil visualisasi interaksi ikatan antara *kojic acid* dan senyawa uji terbaik (*terpinolene*) terhadap reseptor enzim tirosinase dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Interaksi 2D penambatan molekul senyawa terhadap enzim tirosinase: (a) *kojic acid*, (b) *terpinolene*

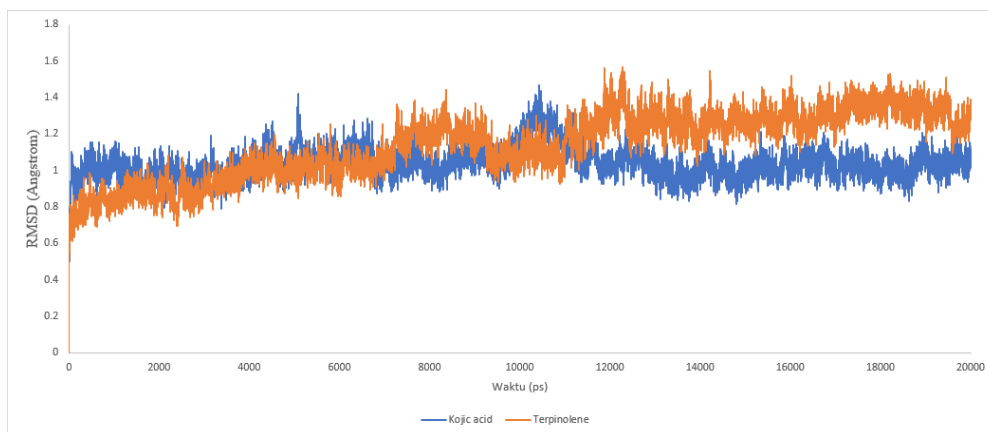
Berdasarkan Gambar 6, terlihat bahwa kompleks *terpinolene* dan kompleks *kojic acid* memiliki pola pergerakan residu asam amino yang identik. Kompleks ligan-reseptor

### Simulasi Dinamika Molekul

Senyawa terpilih yaitu terpinolene dan ligan alam (*kojic acid*), dilanjutkan ke tahap simulasi dinamika molekuler. Simulasi dinamika molekuler (MD) ini memungkinkan untuk mengevaluasi fleksibilitas residu di sisi aktif reseptor dan mengeksplorasi perubahan konformasi yang berpotensi dicapai oleh protein tertentu (Pinzi & Rastelli, 2019).

Berdasarkan Gambar 5, diperkirakan senyawa mengalami perubahan RMSD pada awal hingga pertengahan simulasi dan mulai stabil setelah 15 ns. Nilai RMSD tertinggi yang dicapai oleh *terpinolene* adalah  $\pm 1,5$  Å dan nilai RMSD tertinggi yang dicapai oleh *kojic acid* adalah  $\pm 1,4$  Å. Senyawa *kojic acid* diprediksi mencapai stabilitas yang lebih baik daripada senyawa *terpinolene*, sehingga perlu waktu produksi simulasi dinamika molekuler senyawa terpinolena untuk mencapai stabilitas yang lebih baik.

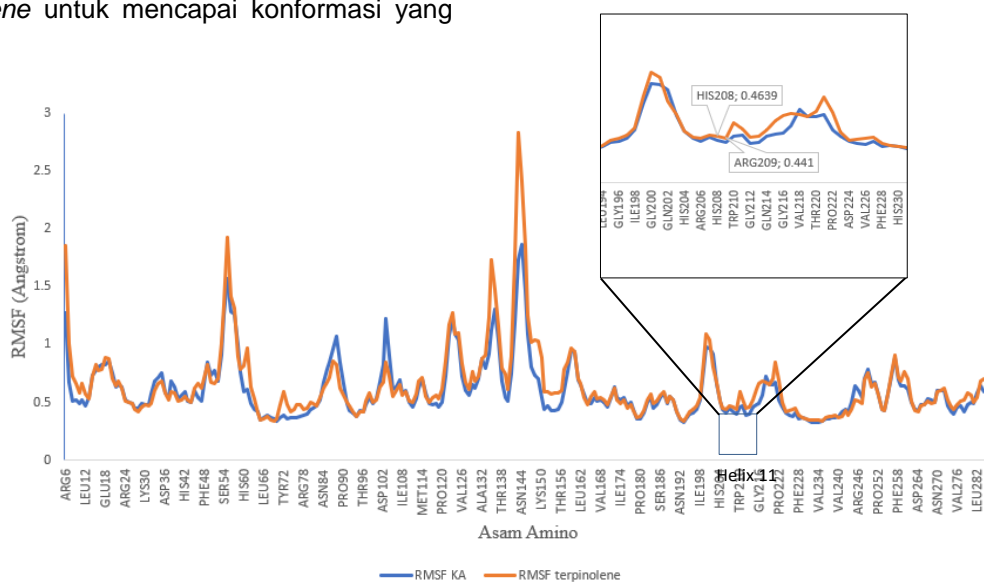
diketahui berikatan dengan sisi aktif reseptor melalui ikatannya dengan asam amino His208 dan Arg209, dan diprediksi stabil karena cenderung berfluktuasi rendah



**Gambar 5.** Plot RMSD dari kompleks ligan-enzim tirosinase: *terpinolene*-enzim tirosinase (oranye) dan *kojic acid*-enzim tirosinase (biru)

Berdasarkan Tabel 5, senyawa ligan alam (asam kojic) diprediksi memiliki nilai energi bebas total ( $\Delta G_{TOTAL}$ ) sebesar -23,81 kkal/mol, sedangkan senyawa terpinolena diprediksi memiliki nilai energi bebas total ( $\Delta G_{TOTAL}$ ) sebesar -7,49 kkal/mol. Dalam hal ini *kojic acid* memiliki nilai  $\Delta G_{TOTAL}$  lebih rendah dibandingkan *terpinolene*, sehingga perlu dilakukan perpanjangan waktu analisis simulasi dinamika molekul senyawa *terpinolene* untuk mencapai konformasi yang

lebih stabil. Interaksi *van der Waals* (vdW) memberikan kontribusi paling besar terhadap sistem, menunjukkan bahwa ikatan senyawa pada sisi aktif reseptor didominasi oleh interaksi dengan asam amino yang bersifat hidrofobik (Mardianingrum *et al.*, 2021). Hal ini membuktikan bahwa interaksi penting bagi senyawa untuk mengikat stabil pada reseptor enzim tirosinase adalah melalui ikatan hidrofobik.



**Gambar 6.** Grafik RMSF kompleks ligan-enzim tirosinase: *terpinolene*-enzim tirosinase (oranye) dan *kojic acid*-enzim tirosinase (biru)

**Tabel 5.** Kalkulasi energi ikatan *terpinolene* dan *kojic acid* terhadap reseptor enzim tirosinase metode MM-GBSA

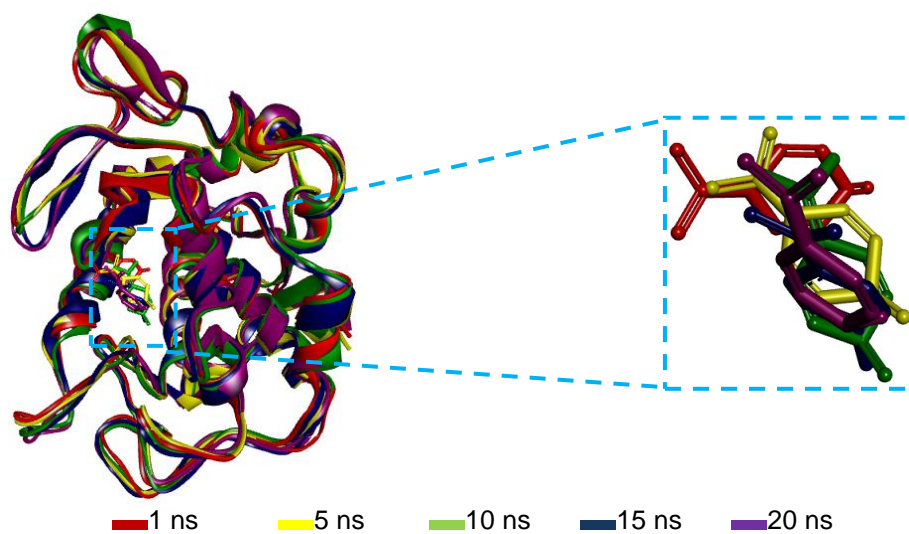
No.	Komponen Energi (kkal/mol)	Nama Senyawa	
		<i>Terpinolene</i>	<i>Kojic acid</i>
1	Interaksi <i>van der Waals</i> (vdW)	-11.50	-23.94
2	Energi Elektronik (EEL)	15.66	-10.34
3	Kontribusi Bebas Solvasi ( $E_{GB}$ )	-9.98	13.73
4	Kontribusi Non-polar terhadap Energi Bebas Solvasi ( $E_{SURF}$ )	-1.67	-3.25
5	$\Delta G_{gas}$ (vdW + EEL)	4.16	-34.29
6	$\Delta G_{solv}$ ( $E_{GB} + E_{SURF}$ )	-11.65	10.47
7	$\Delta G_{TOTAL}$ (vdW + EEL + $E_{GB} + E_{SURF}$ )	-7.49	-23.81

Analisis hasil MD selanjutnya adalah *superimposition* dan visualisasi interaksi antara senyawa dengan enzim tirosinase selama 20 ns. Berdasarkan Tabel 6 terlihat adanya perubahan interaksi yang terjadi dari hasil *docking* dan hasil simulasi dinamika molekul, namun dapat dilihat pada Gambar 7

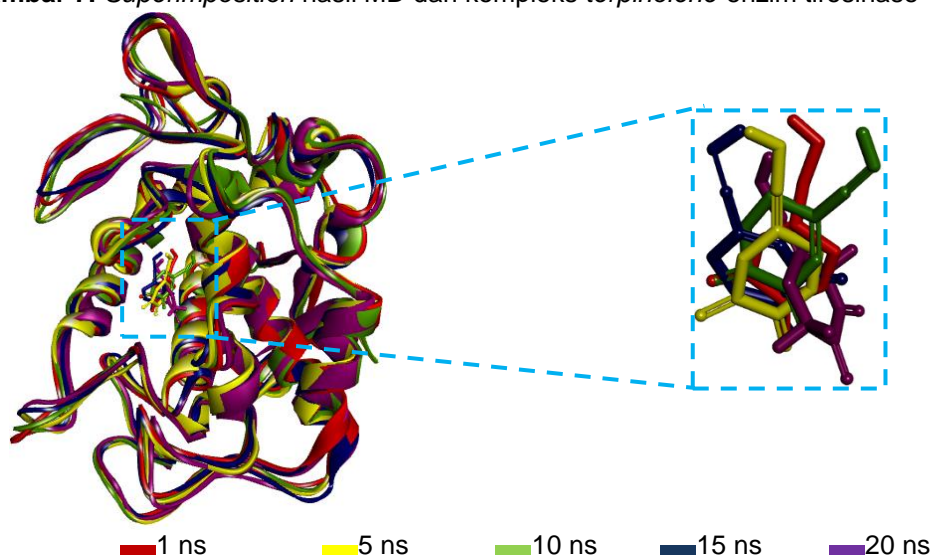
dan 8, senyawa *terpinolene* dan *kojic acid* tetap berinteraksi pada sisi aktif enzim tirosinase. Senyawa *terpinolene* berinteraksi melalui ikatan hidrofobik dengan sisi aktif enzim tirosinase pada residu asam amino His208 dan Arg209.

**Tabel 6.** Interaksi senyawa-enzim tirosinase setelah simulasi dinamika molekul

No.	Nama Senyawa	Waktu simulasi (ns)	Ikatan dengan asam amino	
			Ikatan Hidrofobik	Ikatan Hidrogen
1	<i>Kojic acid</i>	1	His60, His204	His69, Met215, His231
		5	-	His69, Met215, His231
		10	-	His60, His69, His230
		15	-	His69, His204, Met215, His231
		20	-	His42 dan His69
2	<i>terpinolene</i>	1	Asn205, His208, Arg209	-
		5	Arg209, Phe197, Pro201	-
		10	Arg209, Phe197, Pro201	-
		15	Arg209, Phe197, Pro201	-
		20	Arg209	-



**Gambar 7.** Superimposition hasil MD dari kompleks *terpinolene*-enzim tirosinase



**Gambar 8.** Superimposition hasil MD dari kompleks *kojic acid*-enzim tirosinase

## KESIMPULAN

Dari hasil molecular docking disimpulkan bahwa senyawa terpinolene memiliki nilai  $\Delta G$  paling rendah sebesar -5,83 kkal/mol dengan Ki 53,61 M dibandingkan dengan *kojic acid* dan senyawa uji lainnya, didukung dengan hasil simulasi dinamika molekul selama 20 ns menggunakan metode MM-GBSA dengan nilai  $\Delta G$  sebesar -7,4879 kkal/mol. Residu asam amino sisi aktif yang berinteraksi adalah His208 dan Arg209. Dalam hal farmakokinetik dan toksisitas, senyawa *terpinolene* lebih baik dibandingkan ligan alami. Dapat disimpulkan bahwa *terpinolene* diperkirakan akan dilakukan penelitian lebih lanjut sebagai kandidat antitumorigenesis melalui penghambatan enzim tirosinase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, T., Cawood, M., Iqbal, Q., Ariño, A., Batool, A., Sabir Tariq, R. M., Azam, M., & Akhtar, S. (2019). *Phytochemicals in Daucus carota and Their Health Benefits—Review Article*. *Foods*, 8(9), 424.  
<https://doi.org/10.3390/FOODS8090424>
- Allgisna, K. N., Hindun, S., & Rantika, N. (2021). *Review: Perbandingan Beberapa Ekstrak Kulit Buah sebagai Anti-hiperpigmentasi*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(2), 335–342.  
<https://doi.org/10.25026/jsk.v3i2.403>
- Beck, T. C., Beck, K. R., Morningstar, J., Benjamin, M. M., & Norris, R. A. (2021). *Descriptors of cytochrome inhibitors and useful machine learning based methods for the design of safer drugs*. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 472). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph14050472>
- Deri, B., Kanteev, M., Goldfeder, M., Lecina, D., Guallar, V., Adir, N., & Fishman, A. (2016). *The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition*. *Scientific Reports*, 6, 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/srep34993>
- Dermawan, D., Sumirtanuridin, R., & Dewantisari, D. (2019). *Molecular Dynamics Simulation Estrogen Receptor Alpha against Andrographolide as Anti Breast Cancer*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6(2), 65–76.  
<https://doi.org/10.24198/ijpst.v6i2.18168>
- Fakih, T. M., & Dewi, M. L. (2021). *Desain biomolekuler peptida bioaktif laut sebagai inhibitor HIV-1 protease*. *Jurnal Ilmiah Farmasi (Science Journal of Pharmacy)*, 17(2), 160–171.  
<http://journal.uin.ac.id/index.php/JIF>
- Jdey, A., Falleh, H., ben Jannet, S., Mkadmini Hammi, K., Dauvergne, X., Ksouri, R., & Magné, C. (2017). *Phytochemical investigation and antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase performances of six medicinal halophytes*. *South African Journal of Botany*, 112, 508–514.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.016>
- Keilwagen, J., Lehnert, H., Berner, T., Budahn, H., Nothnagel, T., Ulrich, D., & Dunemann, F. (2017). *The Terpene Synthase Gene Family of Carrot (Daucus carota L.): Identification of QTLs and Candidate Genes Associated with Terpenoid Volatile Compounds*. *Frontiers in Plant Science*, 8(1930), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01930>
- Kusuma, A. T., & Hadi, D. (2019). *Virtual Screening Natural Compounds from Plants as Inhibitor of Estrogen Receptor Alpha I (ESR1)*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology, SUPP1*(1), 30–41.  
<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/>
- Laksmiani, N. P. L., & Nugraha, I. P. W. (2019). *Depigmentation Activity of Secang (Caesalpinia Sappan L.) Extract Through Tyrosinase, Tyrosinase Related Protein-1 and Dopachrome Tautomerase Inhibition*. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 12(2), 799–808.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291.  
<https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- Lipinski, C. A. (2004). *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341.



- <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Mardianingrum, R., Bachtiar, K. R., Susanti, S., Aas Nuraisah, A. N., & Ruswanto, R. (2021). Studi *In Silico* Senyawa 1,4-Naphthalenedione-2-Ethyl-3-Hydroxy sebagai Antiinflamasi dan Antikanker Payudara. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 17(1), 83–95.  
<https://doi.org/10.20961/alchemistry.17.1.43979.83-95>
- Mardianingrum, R., Endah, S. R. N., Suhardiana, E., Ruswanto, R., & Siswandono, S. (2021). *Docking and molecular dynamic study of isoniazid derivatives as anti-tuberculosis drug candidate*. *Elsevier: Chemical Data Collections*, 32, 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100647>
- Oh, J., Kim, J., Jang, J. H., Lee, S., Park, C. M., Kim, W. K., & Kim, J. S. (2018). Novel (1E,3E,5E)-1,6-bis(Substituted phenyl)hexa-1,3,5-triene Analogs Inhibit Melanogenesis in B16F10 Cells and Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1067.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19041067>
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). *Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Prasetyo, N. F., Kepel, B. J., Bodhi, W., Fatimawali, Manampiring, A., & Budiarmo, F. (2021). Molecular Docking terhadap Senyawa Isoeuletherin dan Isoeuletherol sebagai Penghambat Pertumbuhan SARS-CoV-2. 9(1), 101–106.  
<https://doi.org/10.35790/ebm.9.1.2021.31809>
- Ratu, B. D. P. M., Bodhi, W., Budiarmo, F., Kepel, B. J., Fatimawati, & Manampiring, A. (2021). *Molecular Docking Senyawa Gingerol dan Zingiberol pada Tanaman Jahe sebagai Penanganan COVID-19*. *EBiomedik*, 9(1), 126–130.  
<https://doi.org/10.35790/ebm.9.1.2021.32361>
- Ruswanto, Mardhiah, Mardianingrum, R., & Novitriani, K. (2015). Sintesis dan Studi *In Silico* Senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-YL) carbonyl] benzohydrazide sebagai Kandidat Antituberkulosis. *Chimica et Natura Acta*, 3(2), 54–61.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.24198/cna.v3.n2.9183>
- Ruswanto, R., Mardianingrum, R., & Yanuar, A. (2022). Computational Studies of Thiourea Derivatives as Anticancer Candidates through Inhibition of Sirtuin-1 (SIRT1). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 25(3), 87–96.  
<https://doi.org/10.14710/jksa.25.3.87-96>
- Ta, G. H., Weng, C.-F., & Leong, M. K. (2021). *In silico Prediction of Skin Sensitization: Quo vadis? Frontiers in Pharmacology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.655771>
- Tabri, F., & Angreni, A. R. (2016). *Tatalaksana Bercak Hitam Pada Kulit Anak* (1st ed., p. 1). Al Hayaatun Mufidah.
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). *ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties*. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5–W14.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- Zardecki, C., Dutta, S., Goodsell, D. S., Lowe, R., Voigt, M., & Burley, S. K. (2022). *PDB-101: Educational resources supporting molecular explorations through biology and medicine*. *Protein Science*, 31(1), 129–140. <https://doi.org/10.1002/pro.4200>
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). *A Comprehensive Review on Tyrosinase Inhibitors*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279–309.  
<https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>