

Studi *In Silico* Senyawa dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap Protein *Dihydrofolate Reductase* (4KM2) pada *Mycobacterium tuberculosis*

Ita Inayah^{1*} Fauziyyah Nur Aini² Ginayanti Hadisoebroto³

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Al-Ghifari, Jl.
Cisaranten Kulon No 140 Bandung Indonesia

E-mail : itainayah@gmail.com

ABSTRAK

Tuberculosis merupakan satu dari 10 penyebab kematian yang merupakan penyebab utama dari agen infeksi tunggal. *Tuberculosis* (TB) adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. *Dihydrofolate reductase* (DHFR) adalah salah satu protein yang berperan penting dalam biosintesis nukleotida dan disetujui sebagai target obat antibakteri dan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mencari senyawa dalam tanaman sambiloto yang paling berpotensi sebagai antituberkulosis. Penelitian ini dilakukan secara *in silico*, tahapan awal dari metode *in silico* adalah pengujian toksisitas dan pengujian ADME secara virtual melalui *web server pro tox II* dan *web server pkCSM*, proses *molecular docking* senyawa uji terhadap protein *Dihydrofolate reductase* menggunakan *software autodock tools* yang dilakukan melalui beberapa tahap yaitu preparasi senyawa uji dan reseptor, validasi metode *docking* dan visualisasi *docking* senyawa uji dengan reseptor menggunakan *software discovery studio*. Hasil *molecular docking* menunjukkan senyawa 7-O-methylwogonin, wogonin dan apigenin merupakan senyawa yang paling berpotensi sebagai obat antituberkulosis dengan nilai *Binding affinity* berturut-turut sebesar -6,59 kkal/mol, -6,49 kkal/mol, -5,80 kkal/mol dan nilai konstanta inhibisi berturut-turut sebesar 14,84 μm , 17,53 μm , 55,87 μm . Selain itu ketiga senyawa tersebut memiliki sisi ikatan dan jenis ikatan yang hampir sama dengan trimethoprim sehingga dapat diprediksikan menjadi kandidat obat antibakteri dan dapat menghambat reseptor *Dihydrofolate reductase*.

Kata kunci : *dihydrofolate reductase, in silico, molecular docking, sambiloto, trimethoprim, tuberculosis*

ABSTRACT

Tuberculosis is one of 10 causes of death which is the main cause of a single infectious agent. *Tuberculosis* (TB) is a contagious infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. *Dihydrofolate reductase* (DHFR) is a protein that plays an important role in nucleotide biosynthesis and is approved as a target for antibacterial and anticancer drugs. This study aims to find compounds in Sambiloto plants that have the most potential for anti-tuberculosis. This research was conducted *in silico*, the initial stages of the *in silico* method were toxicity testing and virtual ADME testing through the *pro tox II* web server and *pkCSM* web server, the *molecular docking* process of the test compound against protein *Dihydrofolate reductase* using *autodock tools* software was carried out through several stages namely preparation of test compounds and receptors, validation of the docking method and visualization of the docking of test compounds with receptors using *discovery studio* software. The results of *molecular docking* showed that the compounds 7-O-methylwogonin, wogonin, and apigenin were the compounds with the most potential as anti-tuberculosis drugs with binding affinity values of -6.59 kcal/mol, -6.49 kcal/mol, -5.80, respectively. kcal/mol and inhibition constant values were 14.84 μm , 17.53 μm , and 55.87 μm respectively. In addition, these three compounds have

almost the same binding sites and types of bonds as trimethoprim, so they can be predicted to be candidates for antibacterial drugs and can inhibit Dihydrofolate reductase receptors.

Keywords : *dihydrofolate reductase, in silico, molecular docking, sambiloto, trimethoprim, tuberculosis*

PENDAHULUAN

Tuberculosis merupakan satu dari 10 penyebab kematian yang merupakan penyebab utama dari agen infeksi tunggal (peringkat di atas HIV/AIDS) (WHO, 2020). Kasus tuberculosis di Indonesia mengalami peningkatan dari 331.703 menjadi 562.049, meningkat 69% pada periode tahun 2015 hingga 2019. Indonesia berada di peringkat kedua setelah India dengan kenaikan kasus tuberculosis sebesar 74% (*World Health Organization.*, 2020).

Dihydrofolate reductase (DHFR) adalah salah satu protein yang berperan penting dalam biosintesis nukleotida serta disetujui sebagai target obat antibakteri dan antikanker. DHFR merupakan enzim yang mengkatalisis nikotinamida adenin dinukleotida fosfat (NADPH) yang bergantung pada reduksi dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat (7,8-DHF menjadi 5,6,7,8 -THF) dalam sel mikroba dan eukariota (Wróbel *et al.*, 2020).

Beberapa *inhibitor* DHFR digunakan secara klinis untuk pengobatan berbagai penyakit menular dan kanker. Baru-baru ini telah ditunjukkan penghambat DHFR dari trimetoprim dan sulfametoksazol dapat mempertahankan aktivitasnya dalam kultur terhadap beberapa strain MDR-TB (Vilchèze & Jacobs, 2012).

Pada saat ini tidak ada penghambat DHFR yang digunakan secara klinis untuk pengobatan TB, namun karena DHFR memiliki peran yang baik untuk menjadi target obat antibakteri, maka dapat membuka peluang dalam pengembangan obat baru sebagai antibakteri terhadap target tersebut (Aragaw *et al.*, 2021)

Studi *in silico* dengan teknik *molecular docking* merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk memprediksi bioaktivitas dari suatu senyawa yang sebelumnya dilakukan analisa percobaan di laboratorium. Metode ini memiliki keunggulan yaitu dapat mengurangi

penggunaan alat dan bahan yang berlebihan serta dapat menghemat dalam pembiayaan percobaan (Frimayanti *et al.*, 2018).

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti bermaksud melakukan pengujian profil farmakokinetik meliputi ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Eliminasi, dan Toksisitas) serta melakukan prediksi sebagai kandidat antibakteri terhadap senyawa herba sambiloto untuk mengetahui interaksi antara senyawa uji dengan protein *Dihydrofolate reductase*.

METODE PENELITIAN

Aplikasi yang digunakan

1. *Web server*
 - a. *PubChem*, *web server* yang digunakan untuk pencarian struktur ligan yang diunduh dalam format sdf, dapat diakses secara gratis melalui situs (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).
 - b. *ProTox web server*, digunakan untuk memprediksi toksisitas, dapat diakses secara gratis di (<http://toxcharite.de>).
 - c. *pkCSM*, *web server* yang digunakan untuk melihat ADME dari suatu ligan uji, dapat diakses secara gratis di (<http://biosig.unimelb.edu.au>).
 - d. *Protein Data Bank*, *web server* yang digunakan untuk pencarian reseptor, dapat diakses gratis melalui situs (<http://www.rcsb.org/>).
 - e. *Lipinski Rule's of Five*, *web server* yang digunakan untuk analisis fisikokimia, dapat diakses secara gratis di (<http://www.scfbio-uitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>).
2. Perangkat Lunak (*software*)
 - a. *Chem3D Pro*, digunakan untuk meminimisasi energi ligan uji dan

mengubah *file* dengan format *cdx* menjadi format *pdb*.

- b. *AutoDockTools*, digunakan untuk *molecular docking* serta preparasi ligan dan reseptor.
- c. *Discovery Studio* 2016, digunakan untuk preparasi reseptor dan visualisasi asam amino.

PROSEDUR PENELITIAN

A. Pencarian reseptor

Pencarian struktur reseptor diperoleh dari *web server Protein Data Bank* dengan mengakses situs <https://www.rcsb.org/>. Langkah pencarian struktur reseptor di PDB adalah sebagai berikut :

1. Struktur reseptor yang digunakan diunduh dengan format *.*pdb*.
2. Reseptor yang digunakan harus mempunyai resolusi ≤ 2 Å dan tidak bermutasi.
3. Reseptor yang telah diunduh, dipreparasi menggunakan *software Discovery studio*.

B. Mencari struktur ligan uji

Pencarian struktur ligan uji senyawa sampiloto diperoleh dari *web server pubchem* yang diakses pada (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) Setelah situs *pubchem* diakses, pada kolom *search* dimasukkan nama senyawa dan diklik sesuai dengan senyawa yang dicari lalu diunduh dalam format *sdf*.

C. Melakukan uji toksisitas

Pengujian toksisitas senyawa sampiloto diuji menggunakan *ProTox web server* dengan mengakses situs (<http://tox.charite.de/prottoxII/>).

Setelah mengakses situs *prottox*, pengujian toksisitas dilakukan pada bagian *tox prediction* dengan memasukkan kode *cannonical smile* dari *pubchem* pada senyawa yang akan diuji.

D. Uji ADME

Pengujian ADME dilakukan melalui *web pkCSM*. *pkCSM* adalah *database*

yang menyediakan data untuk senyawa uji dengan memprediksi sifat farmakokinetik suatu senyawa. Berikut langkah pengujian ADME pada senyawa sampiloto melalui *website pkCSM* :

1. Dimasukkan ke *web server* (http://biosig.unimelb.edu.au/pkcs_m/), maka akan ditampilkan halaman *pkCSM*.
2. *Step1*: perintah untuk memasukan rumus *cannonical smiles* dari senyawa yang akan diuji.
3. *Step2*: diklik tombol “ADMET” maka akan tampil deskripsi prediksi profil farmakokinetik dan sifat fisikokimia dari senyawa yang akan diuji.

E. Uji lipinski rule's of five

Senyawa diuji dengan mengakses secara gratis pada situs lipinski (<http://www.scfbioiitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>). Setelah mengakses *web server* lipinski, struktur kimia senyawa uji yang telah diunduh melalui *pubchem* dalam format *sdf*, dimasukkan pada perintah *input drug file*, lalu diklik tombol submit maka akan terlihat hasil uji lipinski.

F. Molecular docking

Molecular docking dilakukan dengan menggunakan program *AutoDockTools*. Adapun tahapan *molecular docking* adalah sebagai berikut :

1. Preparasi reseptor dan ligan
Reseptor dan ligan uji yang telah diunduh dari masing-masing *web server*, disimpan dalam satu folder. Preparasi reseptor dan ligan uji dilakukan menggunakan aplikasi *Discovery studio*.
2. Validasi metode *docking*
Validasi dilakukan dengan cara menambatkan atau *docking* ulang *native ligand* dengan reseptor yang dipilih. Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan melihat nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) Metode

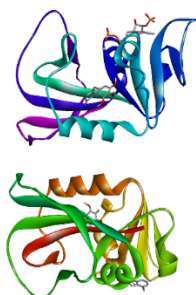
docking dikatakan valid apabila nilai RMSD ≤ 2 Å (Fauzan *et al.*, 2019).

3. *Molecular docking* dan analisis data
Molecular docking dilakukan menggunakan aplikasi *Autodock tools*, penambatan dilakukan untuk memprediksi interaksi antara ligan dengan reseptor. Analisis data penambatan molekul yang akan dianalisis meliputi energi bebas *Gibbs*, nilai konstanta inhibisi, ikatan hidrogen dan kemiripan residu asam amino dari masing-masing ligan uji (Sari *et al.*, 2020).

HASIL PENELITIAN

Preparasi reseptor

Proses penambatan molekul diawali dengan menyiapkan reseptor yang akan digunakan, dalam penelitian ini jenis protein enzim yang digunakan adalah “*Crystal structure of Dihydrofolate reductase from Mycobacterium tuberculosis in an open conformation in complex with trimethoprim*”. Penelitian ini melibatkan protein enzim *Dihydrofolate reductase* dari *Mycobacterium tuberculosis*, protein enzim tersebut digunakan untuk mengetahui aktivitas yang dimiliki oleh ligan uji terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.



Gambar 1. Struktur 3D enzim *Dihydrofolate reductase* dengan *trimethoprim* (kode PDB 4KM2)

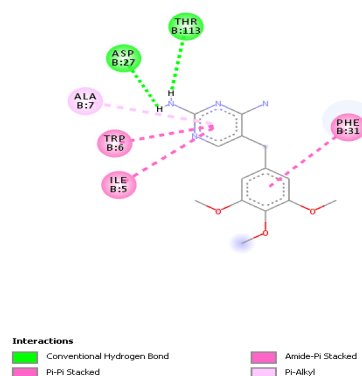
Struktur kristal dari reseptor digunakan untuk memisahkan antara makromolekul dan *native ligand* yang menempel pada reseptor dengan

menggunakan *software Discovery studio 2016*.

Saat preparasi reseptor pada *Discovery studio* biasanya struktur protein mengandung molekul pelarut berupa air dan residu lainnya, maka diperlukan proses penghilangan molekul air dengan tujuan agar tidak mengganggu proses *docking* serta memastikan bahwa yang berinteraksi adalah ligan dengan reseptor.

Setelah preparasi selesai, reseptor dan *native ligand* disimpan dalam satu *file* dengan format *.pdb, saat preparasi pada aplikasi *Autodock Tools* perlu penambahan atom hidrogen untuk menyesuaikan suasana *docking* agar mendekati pH 7, preparasi *native ligand trimethoprim* menggunakan *autodock tools* dilakukan dengan penambahan muatan gasteiger serta pengaturan *merge non polar*. Setelah selesai preparasi reseptor dan ligan disimpan dengan format *.pdbqt (Sari *et al.*, 2020).

Struktur reseptor 3D yang diperoleh dari PDB akan divisualisasikan menjadi 2D melalui aplikasi *Discovery studio*. Dalam bentuk 2D akan terlihat lebih jelas jenis dan sisi ikatan antara ligan dengan proteinnya.

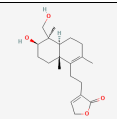
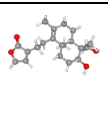
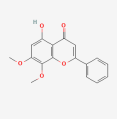
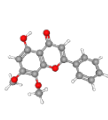
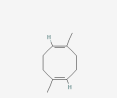
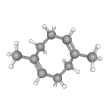
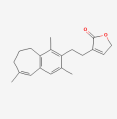
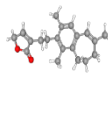
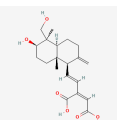
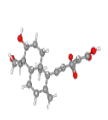
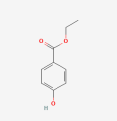
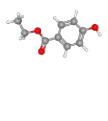
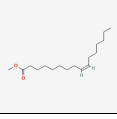
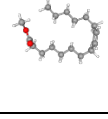
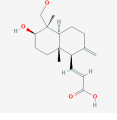
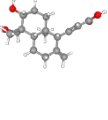
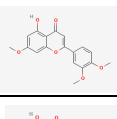
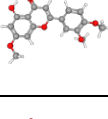
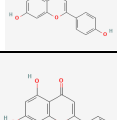
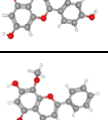
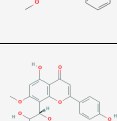
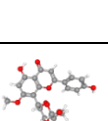
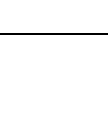


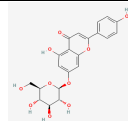
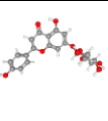
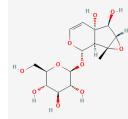
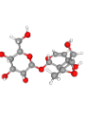
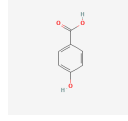
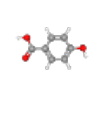
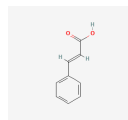
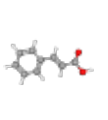
Gambar 2. Visualisasi interaksi 2D *Trimethoprim* dengan Asam amino

PubChem

Struktur 2D dan 3D dari 16 senyawa yang merupakan ligan uji diunduh melalui *web server PubChem*. Berikut merupakan gambar struktur dari ke 16 ligan uji yang akan digunakan dalam penelitian:

Tabel 1. Struktur 2D dan 3D senyawa uji

Nama Senyawa	Struktur 2D	Struktur 3D
<i>Deoxyandrographolide</i>		
<i>7-O-Methylwogonin</i>		
<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>		
<i>Andrographolactone</i>		
<i>Andrographic acid</i>		
<i>Ethyl paraben</i>		
<i>Methyl palmitoleate</i>		
<i>*(E)-[X]-prop-2-enoic acid</i>		
<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>		
<i>Apigenin</i>		
<i>Wogonin</i>		
<i>Isoswertisin</i>		

Nama Senyawa	Struktur 2D	Struktur 3D
<i>Cosmosiin</i>		
<i>Procumbide</i>		
<i>p-hydroxybenzoic acid</i>		
<i>Cinnamic acid</i>		

Keterangan :

**(E)-[X]-prop-2-enoic acid* = (E)-3-[(1R,4aS,5R,6R,8aR)-6-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-5,8a-dimethyl-2-methylidene-3,4,4a,6,7,8-hexahydro-1H-naphthalen-1-yl]prop-2-enoic acid.

Penting untuk mengetahui terlebih dahulu struktur ligan yang akan digunakan agar dapat mengetahui ikatan yang dimiliki oleh senyawa ligan, diperlukan juga *file* senyawa 3D dengan format *file* *.pdb untuk digunakan pada proses validasi dan *docking* dalam aplikasi yang akan telah disiapkan.

ProTox II web server

Penilaian awal dari sifat toksik pada struktur kimia sangat penting dilakukan dalam bidang penemuan obat. Dengan demikian, melakukan uji toksisitas pada studi *in silico* adalah hal utama yang harus dilakukan untuk mengetahui senyawa atau bahan kimia apa saja yang dapat berbahaya. Pengujian toksisitas dilakukan dengan menggunakan *web server Protox II* dimana *web server* tersebut merupakan salah satu pengujian toksisitas yang tersedia secara gratis dan digunakan untuk memprediksi potensi toksisitas dalam bentuk basis data dengan menggunakan struktur kimia dari senyawa yang akan digunakan.

Tabel 2. Hasil Prediksi Toksisitas Senyawa Uji

No.	Nama Senyawa	LD ₅₀ mg/kg	Predicted tox class
1.	Trimethoprim	3500	5
2.	Deoxyandrographolide	5000	4
3.	7-O-Methylwogonin	3919	5
4.	1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene	5000	5
5.	Andrographolactone	2000	4
6.	Andrographic acid	4800	5
7.	Ethyl paraben	2500	5
8.	Methyl palmitoleate	3000	5
9.	*E-[X]-prop-2-enoic acid	1925	4
10.	5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	4000	5
11.	Apigenin	2500	5
12.	Wogonin	3919	5
13.	Isoswertisin	832	4
14.	Cosmosiin	5000	5
15.	Procumbide	2000	4
16.	p-hydroxybenzoic acid	2200	5
17.	Cinnamic acid	2500	5

Hasil prediksi toksisitas ditampilkan dalam bentuk tabel, pada tabel toksisitas oral tercantum kolom prediksi LD₅₀ (*lethal dose* ₅₀), LD₅₀ merupakan rata-rata dosis tunggal dari suatu senyawa yang dapat menyebabkan 50% kematian pada subjek uji dalam satuan mg/kg. Selain itu pada kolom *predicted toxicity class* yang dinyatakan dalam rentang kelas 1-6, dimana semakin besar angka yang diperoleh maka prediksi toksik suatu senyawa akan semakin baik, sebaliknya jika semakin kecil nilai yang didapat maka prediksi toksik suatu senyawa akan semakin buruk (Banerjee *et al.*, 2018).

Klasifikasi LD₅₀ berdasarkan rentang dosis dengan LD₅₀ dibawah 5-50 mg/kg diklasifikasikan sebagai sangat beracun, 50-500 mg/kg diklasifikasikan cukup beracun, 500-5000 mg/kg diklasifikasikan sedikit beracun, 5.000-15.000 mg/kg diklasifikasikan praktis tidak beracun dan dosis diatas 15.000 mg/kg disebut relatif tidak berbahaya.

Berdasarkan hasil uji toksisitas menggunakan *protox II web server*

diperoleh data hasil pada LD₅₀ yang ditunjukkan pada tabel 2 menunjukkan bahwa semua ligan uji dan *native ligand* yang digunakan aman untuk dijadikan obat. Berdasarkan nilai LD₅₀, 16 senyawa uji berada diposisi kelas dengan klasifikasi “sedikit toksik” yaitu berada di angka 500-5.000 mg/kg. Senyawa uji *deoxyandrographolide*, *1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene* dan *cosmosiin* memiliki tingkatan toksisitas yang lebih baik dari senyawa uji lain dengan nilai LD₅₀ yang cukup besar yaitu 5000 mg/Kg.

Berdasarkan hasil uji toksisitas data hasil *predicted class* yang dicantumkan pada tabel 2 senyawa uji yang akan digunakan berada pada kelas 4 dan 5, sebanyak 11 senyawa uji berada dikelas 5 dan 5 senyawa uji lainnya berada dikelas 4.

Tabel 3. Hasil Prediksi *similarity* dan *accuracy*

No	Nama Senyawa	Average similarity	Prediction accuracy
1.	Trimethoprim	100%	100%
2.	Deoxyandrographolide	76,85%	69,26%
3.	7-O-Methylwogonin	96,19%	72,9%
4.	1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene	100%	100%
5.	Andrographolactone	54,14%	67,38%
6.	Andrographic acid	63,55%	68,07%
7.	Ethyl paraben	100%	100%
8.	Methyl palmitoleate	89,64%	70,97%
9.	* (E)-[X]-prop-2-enoic acid	74,99%	69,26%
10.	5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	80,3%	70,97%
11.	Apigenin	81,24%	70,97%
12.	Wogonin	100%	100%
13.	Isoswertisin	60,23%	68,07%
14.	Cosmosiin	78,96%	69,26%
15.	Procumbide	69,43%	68,07%
16.	p-hydroxybenzoic acid	100%	100%
17.	Cinnamic acid	100%	100%

Semua ligan yang diujikan dalam penelitian ini memiliki nilai *similarity* dan *accuracy* yang baik, dimana semua nilainya melebihi 50%. *1,5-dimethyl-1,5-*

cyclooctadiene, ethyl paraben, wogonin, p-hydroxybenzoic acid, cinnamic acid memiliki nilai *similarity* dan *accuracy* terbaik yaitu 100%.

Melalui *protox II web server* diperoleh data mengenai prediksi toksisitas

senyawa secara spesifik. prediksi titik akhir toksisitas dalam *protoxII web server* meliputi hepatoksisitas, karsinogenisitas, imunotoksisitas, mutagenisitas dan sitotoksisitas.

Tabel 4. Hasil Uji Toksisitas pada target organ dari senyawa uji

No.	Nama Senyawa	Hepatotoxicity	Carcinogenicity	Immunotoxicity	Mutagenicity	Cytotoxicity
1.	<i>Trimethoprim</i> (native ligand)	Inactive	Active	Active	Inactive	Inactive
2.	<i>Deoxyandrographolide</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
3.	<i>7-O-Methylwogonin</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
4.	<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
5.	<i>Andrographolactone</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
6.	<i>Andrographic acid</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
7.	<i>Ethyl paraben</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
8.	<i>Methyl palmitoleate</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
9.	<i>(E)-[X]-prop-2-enoic acid</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
10.	<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
11.	<i>Apigenin</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
12.	<i>Wogonin</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
13.	<i>Isoswertisin</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
14.	<i>Cosmosiin</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Active	Inactive
15.	<i>Procumbide</i>	Inactive	Inactive	Active	Inactive	Inactive
16.	<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
17.	<i>Cinnamic acid</i>	Active	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

Berdasarkan tabel 4, diperoleh data hasil toksisitas pada organ yang menunjukkan bahwa senyawa uji *cosmosiin* memiliki efek toksik berupa mutagen, *procumbide* memiliki efek toksisitas pada imunitas, *cinnamic acid* memiliki efek toksisitas pada hepar sedangkan pada *trimethoprim* yang berperan sebagai *native ligand* memiliki efek toksisitas pada imunitas dan bersifat karsinogen, sedangkan 13 senyawa uji lainnya tidak memiliki efek toksisitas pada target organ.

Uji ADME

Pengujian ADME dilakukan menggunakan *web server* pkCSM. pkCSM adalah *web server* yang berisi *database* untuk memprediksi aktivitas farmakokinetik dari suatu senyawa. Aktivitas farmakokinetik tersebut terdiri dari 4 proses diantaranya absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi.

A. Absorpsi

Absorpsi adalah proses penyerapan senyawa bioaktif dari tempat pemberian obat menuju sirkulasi sistemik. Terdiri dari beberapa aspek yang terlibat dalam proses absorpsi yaitu *water solubility*, *Caco-2 Permeability*, *Intestinal absorption* dan *skin permeability*.

Tabel 5. Hasil analisis absorpsi senyawa sambiloto

Nama Senyawa	Water Solubility (log mol/L)	CaCO ₂ permeability (cm/s)	Intestinal absorption (%)
<i>Trimethoprim</i>	-2.67	0.606	79.51
<i>Deoxyandrographolide</i>	-3.885	0.894	95.5
<i>7-O-Methylwogonin</i>	-3.431	1.194	94.74
<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>	-3.447	1.4	95.56
<i>Andrographolactone</i>	-5.17	1.646	95.88
<i>Andrographic acid</i>	-2.178	0.598	22.54
<i>Ethyl paraben</i>	-2.098	1.223	93.72
<i>Methyl palmitoleate</i>	-6.806	1.607	92.84
<i>* (E)-[X]-prop-2-enoic acid</i>	-2.945	0.996	96.041
<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>	-3.935	1.161	95.35
<i>Apigenin</i>	-3.329	1.007	93.25
<i>Wogonin</i>	-3.469	0.969	92.68
<i>Isoswertisin</i>	-3.042	0.23	57.35
<i>Cosmosiin</i>	-2.559	0.33	37.60
<i>Procumbide</i>	-2.479	0.459	20.07
<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	-1.877	1.151	83.96
<i>Cinnamic acid</i>	-2.608	1.717	94.83

Senyawa yang memiliki nilai *water solubility* <-6 menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki kelarutan dalam air yang rendah (Pires *et.al.*, 2021). Berdasarkan hasil prediksi pada tabel 5 senyawa yang memperoleh nilai *water solubility* yang rendah yaitu *methyl palmitoleate*, hal ini menunjukkan bahwa 15 senyawa uji lainnya beserta *native ligand* memiliki kelarutan yang cukup baik.

Senyawa uji diharapkan memiliki nilai permeabilitas CaCo-2 yang tinggi. CaCO-2 digunakan untuk memprediksi penyerapan obat yang diberikan secara oral untuk mengetahui *transport* obat melalui epitel intestinal yang berasal dari sel karsinoma manusia. Nilai prediksi permeabilitas

CaCo-2 yang tinggi akan menunjukkan nilai >0,90 (Pires *et al.*, 2015).

Pada tabel 5, hasil prediksi nilai permeabilitas CaCO₂ menunjukkan bahwa *native ligan* (*trimethoprim*) dan 5 senyawa uji yang hasilnya <0,90 diantaranya *deoxyandrographolide*, *andrographic acid*, *isoswertisin*, *cosmosiin* dan *procumbide*, sedangkan 11 senyawa uji lainnya menunjukkan hasilnya sudah memenuhi standar.

Intestinal Absorption berhubungan dengan usus manusia untuk penyerapan obat yang diberikan secara oral. Persentasi senyawa yang dapat diserap melalui usus manusia dengan absorpsi <30% menunjukkan bahwa penyerapannya kurang baik (Pires *et al.*, 2015). Pada tabel 4 hasil analisis *intestinal absorption* menunjukkan bahwa ke 14 senyawa uji memiliki nilai *intestinal absorpction* yang bagus yaitu diatas 30% yang artinya senyawa tersebut dapat diserap baik oleh usus, namun 2 senyawa uji lainnya yaitu *andrographic acid* dan *procumbide* menunjukkan hasil kurang dari 30% dengan hasil *andrographic acid* 22,54% dan *procumbide* 20,079%, hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut memiliki penyerapan yang buruk di usus.

B. Distribusi

Distribusi adalah tahap lanjutan setelah proses absorpsi, distribusi adalah proses penyebaran obat keseluruh tubuh melalui aliran darah menyebar ke otot dan organ. Menggunakan *web server pkCSM* terdapat 4 aspek yang dijadikan sebagai parameter yaitu nilai VDSS (log L/Kg), *Fraction unbound* (Fu), BBB *permeability* (log BB) dan CNS *permeability* (log PS).

Tabel 6. Hasil Prediksi Distribusi senyawa uji sambiloto

No	Nama Senyawa	VDSS (log L/Kg)	BBB Permeability (log BB)	CNS Permeability (log PS)
1.	<i>Trimethoprim (native ligand)</i>	0.193	-0.234	-3.113

2.	<i>Deoxyandrographolide</i>	-0.069	0.06	-3.274
3.	<i>7-O-Methylwogonin</i>	0.022	-0.29	-2.228
4.	<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>	0.37	0.528	-2.487
5.	<i>Andrographolactone</i>	0.907	0.308	-2.258
6.	<i>Andrographic acid</i>	-1.21	-0.898	-3.323
7.	<i>Ethyl paraben</i>	0.059	0.352	-2.284
8.	<i>Methyl palmitoleate</i>	0.306	0.739	-1.625
9.	<i>* (E)-[X]-prop-2-enoic acid</i>	-1.004	-0.606	-2.538
10.	<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>	-0.162	-0.711	-2.287
11.	<i>Apigenin</i>	0.822	-0.734	-2.061
12.	<i>Wogonin</i>	0.034	-0.232	-2.18
13.	<i>Isoswertisin</i>	0.745	-1.347	-4.09
14.	<i>Cosmosiin</i>	0.342	-1.391	-3.746
15.	<i>Procumbide</i>	0.292	-1.093	-3.867
16.	<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	-1.557	-0.334	-3.21
17.	<i>Cinnamic acid</i>	-1.051	0.446	-1.834

VDss (*Steady state of volume distribution*) adalah dosis total obat yang didistribusikan secara merata untuk memberikan konsentrasi yang sama seperti pada plasma darah. Volume Distribusi (VDss) dianggap rendah jika di bawah 0,71 L/kg ($\log \text{VDss} < -0,15$) dan tinggi jika di atas 2,81 L/kg ($\log \text{VDss} > 0,45$). Perolehan nilai VDss yang semakin tinggi, maka semakin banyak obat yang didistribusikan ke jaringan daripada plasma (Pires *et al.*, 2015).

Berdasarkan pada tabel 6 hasil prediksi distribusi menggunakan web server pkCSM diketahui bahwa sebanyak 14 senyawa uji dan *native ligand* memiliki nilai VDss rendah karena hasilnya menunjukkan nilai dibawah 0,71 L/kg ($\log \text{VDss} < -0,15$), sebanyak 3 senyawa uji lainnya yaitu *andrographolactone*, *apigenin* dan *isoswertisin* menunjukkan nilai diatas 2,81 L/kg ($\log \text{VDss} > 0,45$).

Blood-Brain Barrier (BBB *permeability*) merupakan kemampuan obat untuk masuk ke otak melalui sawar darah otak yang berperan penting untuk membantu mengurangi efek samping. senyawa yang memiliki $\log \text{BB} > 0,3$ dianggap mudah melewati sawar darah-otak, sedangkan senyawa ligand dengan $\log \text{BB} < -1$ kurang terdistribusi ke otak (Pires *et al.*, 2015).

Pada tabel 6 hasil dari BBB *permeability* menunjukkan sebagian besar senyawa uji bahkan *native ligand* kurang

baik untuk terdistribusi ke otak, hanya senyawa uji *1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene*, *andrographolactone*, *ethyl paraben*, *methyl palmitoleate* dan *cinnamic acid* yang memiliki nilai $\log \text{BB} > 0,3$.

CNS *permeability* adalah suatu senyawa yang dapat menembus sistem saraf pusat dengan parameter senyawa $\log \text{PS} > -2$ dapat menembus sistem saraf pusat dan senyawa dengan $\log \text{PS} < -3$ dianggap tidak dapat menembus sistem saraf pusat (Pires *et al.*, 2015). Hasil dengan nilai $\log \text{PS} > -2$ yang dapat menembus sistem saraf pusat yaitu *methyl palmitoleate* dan *cinnamic acid*. Sedangkan senyawa uji lainnya dan *native ligand* tidak dapat menembus sistem saraf pusat.

C. Metabolisme

Metabolisme adalah proses perubahan struktur kimia obat yang terjadi didalam tubuh dan dikatalis oleh enzim. Sitokrom P450 adalah superfamili enzim yang mengandung heme sekitar 57 isoform serta mengkatalisasi metabolisme berbagai senyawa endogen dan xenobiotik. Enzim CYP, terutama isoform 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, dan 3A4, bertanggung jawab atas sekitar 90% reaksi metabolisme oksidatif. Enzim CYP sebagian besar menempati hati, usus dan ginjal, namun konsentrasi tertinggi terdapat di hati. Penghambatan enzim CYP akan menyebabkan penghambatan metabolisme obat yang berakibat fatal (Cheng *et al.*, 2011). Sebesar 72% enzim sitokrom P450 yang bertanggung jawab pada metabolisme obat yaitu CYP2D6 dan CYP3A4 (Esteves *et al.*, 2021).

Tabel 7. Hasil Prediksi Metabolisme Senyawa uji

Nama Senyawa	CYP2D6 substrate	CYP3A4 substrate	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor
<i>Trimethoprim (native ligand)</i>	No	No	No	No
<i>Deoxyandrographolide</i>	No	Yes	No	No
<i>7-O-Methylwogonin</i>	No	Yes	No	Yes
<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>	No	No	No	No

Nama Senyawa	CYP2D6 substrate	CYP3A4 substrate	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor
<i>Andrographolactone</i>	No	Yes	No	No
<i>Andrographic acid</i>	No	No	No	No
<i>Ethyl paraben</i>	No	No	No	No
<i>Methyl palmitoleate</i>	No	Yes	No	No
<i>*(E)-[X]-prop-2-enoic acid</i>	No	No	No	No
<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>	No	Yes	No	Yes
Apigenin	No	No	No	No
Wogonin	No	Yes	No	Yes
Isoswertisin	No	No	No	No
Cosmosiin	No	No	No	No
<i>Procumbide</i>	No	No	No	No
<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	No	No	No	No

Hasil pengujian metabolisme pada tabel 7 menggunakan *web server* pkCSM menunjukkan bahwa semua senyawa tidak berperan pada metabolisme CYP2D6 substrat dan *inhibitor*, namun terdapat 7 senyawa uji yang berperan pada sitokrom CYP3A4 *substrate* diantaranya *Deoxyandrographolide*, *7-O-Methylwogonin*, *andrographolactone*, *Methyl palmitoleate*, *5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone* dan *wogonin*, namun terdapat senyawa uji yang terlibat pada CYP3A4 sebagai *inhibitor* diantaranya yaitu *7-O-methylwogonin*, *5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone* dan *wogonin*.

D. Ekskresi

Ekskresi adalah proses pembuangan dari zat sisa metabolisme yang sudah tidak dibutuhkan lagi. Pada analisis hasil prediksi yang dilakukan pada *web server* pkCSM nilai yang dijadikan sebagai parameter dari ekskresi yaitu dilihat dari total *clearance* dan renal OCT2. Klirens ginjal adalah hasil dari beberapa proses, termasuk filtrasi ginjal, sekresi ginjal, dan reabsorpsi ginjal. Total klirens merupakan jumlah dari pembersihan hati dan ginjal yang memungkinkan untuk menentukan dosis yang diperlukan untuk mengontrol paparan obat secara keseluruhan. Semakin besar jumlah total *Clearance* maka akan semakin cepat suatu obat berkurang konsentrasinya dalam darah (Follman & Morris, 2018).

Organic cation transporter 2 (OCT2) adalah transporter uptake ginjal yang berperan penting dalam perpindahan dan *clearance* obat serta senyawa endogen di ginjal. Substrat OCT2 juga memiliki potensi interaksi yang merugikan jika diberikan bersama *inhibitor* OCT2 (Abdullah *et al.*, 2021).

Tabel 8. Hasil Prediksi Ekskresi Senyawa Uji

No.	Nama Senyawa	Total Clearance (log ml/min/kg)	Renal OCT2
1.	<i>Trimethoprim (native ligand)</i>	0.381	No
2.	<i>Deoxyandrographolide</i>	1.163	No
3.	<i>7-O-Methylwogonin</i>	0.413	Yes
4.	<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>	0.214	No
5.	<i>Andrographolactone</i>	1.288	No
6.	<i>Andrographic acid</i>	1.264	No
7.	<i>Ethyl paraben</i>	0.748	No
8.	<i>Methyl palmitoleate</i>	1.914	No
9.	<i>*(E)-[x]prop-2-enoic acid</i>	1.222	No
10.	<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>	0.749	No
11.	Apigenin	0.566	No
12.	Wogonin	0.294	No
13.	Isoswertisin	0.532	No
14.	Cosmosiin	0.547	No
15.	<i>Procumbide</i>	1.182	No
16.	<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	0.593	No
17.	<i>Cinnamic acid</i>	0.781	No

Hasil prediksi ekskresi pada tabel 8 menunjukkan bahwa nilai total *clearance* tertinggi terdapat pada senyawa *methyl palmitoleate* yaitu 1,914 sedangkan *native ligand* memiliki nilai total *clearance* yang rendah yaitu 0,381 (log ml/min/kg). Pada pengujian ekskresi terhadap renal OCT2 ada 2 senyawa yang dapat menyebabkan kontraindikasi yaitu *7-O-methylwogonin*.

Uji Lipinski rule's of five

Analisis sifat fisikokimia berdasarkan aturan *Lipinski Rule's of Five* dilakukan untuk mengetahui sifat fisika dan kimia dari suatu senyawa dengan mengamati permeabilitas dalam obat dengan aktivitas

farmakologi dan biologi tertentu . Sesuai dengan aturan Lipinski, analisis sifat fisikokimia ditentukan untuk mengamati permeabilitas obat dalam melakukan difusi pasif terhadap *lipid bilayer* pada tubuh target. Persyaratan *Lipinski* terdiri dari berat molekul (BM) <500 Dalton, nilai koefisien partisi (log P) <5, jumlah donor ikatan hidrogen harus kurang dari 5, serta akseptor

ikatan yang dimiliki kurang dari 10 (Sukmawaty *et al.*, 2021).

Aturan lipinski juga digunakan untuk mempertimbangkan senyawa aktif yang dapat diadministrasikan secara oral, sehingga senyawa yang tidak memenuhi syarat lipinski tersebut tidak dapat dibuat menjadi sediaan oral (Riyaldi *et al.*, 2022).

Tabel 9. Hasil Uji Lipinski Rule's of five

No.	Nama Senyawa/Ligan uji	BM (g/mol)	Donor H	Akseptor H	Log P
1.	<i>Trimethoprim (native ligand)</i>	290	4	7	1.257600
2.	<i>Deoxyandrographolide</i>	334	2	4	3.135899
3.	<i>7-O-Methylwogonin</i>	298	1	5	2.840800
4.	<i>1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene</i>	136	0	0	3.452999
5.	<i>Andrographolactone</i>	296	0	2	4.458839
6.	<i>Andrographic acid</i>	364	4	6	2.380200
7.	<i>Ethyl paraben</i>	166	1	3	1.568900
8.	<i>Methyl palmitoleate</i>	268	0	2	5.416700
9.	* (E)-[X]-prop-2-enoic acid	294	3	4	2.369200
10.	<i>5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone</i>	328	1	6	3.034199
11.	Apigenin	270	3	5	2.419599
12.	Wogonin	284	2	5	2.722598
13.	Isoswertisin	446	6	10	0.237500
14.	Cosmosiin	432	6	10	-0.107300
15.	<i>Procumbide</i>	362	6	10	3.447801
16.	<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	138	2	3	1.090400
17.	<i>Cinnamic acid</i>	148	1	2	1.784400

Berdasarkan hasil analisis dari ke 16 senyawa uji telah memenuhi standar lipinski yang telah ditetapkan, sehingga senyawa tersebut dapat berdifusi pasif dalam membran sel. Senyawa *isoswertisin*, *comosiin* dan *procumbide* telah memenuhi ketiga syarat lipinski tetapi donor ikatan hidrogen memiliki nilai yang melebihi standar. Secara umum aturan Lipinski menggambarkan solubilitas senyawa tertentu untuk menembus membran sel oleh difusi pasif, jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen mendeskripsikan semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan

untuk terjadinya proses absorpsi (Syahputra *et al.*, 2014).

Nilai log P menggambarkan kemampuan senyawa untuk dapat larut dalam cairan *membrane* biologis. Semakin besar nilai log P, maka semakin hidrofobik molekul tersebut. Molekul yang memiliki sifat terlalu hidrofobik cenderung memiliki tingkat toksisitas yang besar karena akan tertahan lebih lama pada *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektifitas ikatan menjadi berkurang terhadap enzim target (Adriani, 2018).

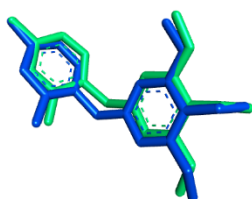
Molecular docking

Validasi Metode Docking

Proses validasi metode *docking* dilakukan dengan cara men-*docking*kan kembali (*redocking*) antara ligan alami (*trimethoprim*) dengan reseptor *Dihydrofolate reductase* (4KM2) menggunakan aplikasi *autodock tools*.

Proses validasi *docking* menggunakan pengaturan angka *grid box* dengan ukuran 26x20x20 yang mencakup seluruh bagian *native ligand* dengan angka *grid center* yang digunakan yaitu x=18.785, y=30.569, z=16.764 serta spasi 0.375. *Gridbox* berfungsi untuk menentukan daerah reseptor yang akan ditambatkan berdasarkan koordinat x, y dan z dari senyawa ligan alami *trimethoprim* dengan tujuan utama untuk mengetahui konformasi energi ligan terendah (Sari *et al.*, 2020). *Grid box* adalah tempat dimana ligan akan berinteraksi dengan residu pada target enzim dan digambarkan dengan bentuk kubus (Rachmania *et al.*, 2016).

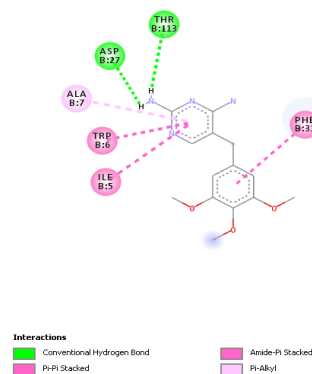
Parameter validasi yang digunakan untuk *docking* yaitu nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD dijadikan sebagai parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi protein dan ligan pada struktur kristal sebelum dan sesudah di *docking* untuk mengetahui nilai penyimpangannya. Metode *docking* dikatakan valid apabila RMSD ≤ 2 Å, yang berarti parameter *docking* yang digunakan telah valid sehingga metode *docking* dapat digunakan untuk melakukan *docking* senyawa uji (Sari *et al.*, 2020).



Gambar 3. Hasil Validasi Docking Trimethoprim sebelum docking (hijau) dan sesudah docking (biru)

Jika validasi *docking* telah dilakukan, selanjutnya validasi metode *docking* divisualisasikan menggunakan program *Discovery Studio 2016*. Hasil validasi pada reseptor *Dihydrofolate reductase* diperoleh nilai RMSD 0,521 Å dengan nilai energi ikatan (*binding affinity*) sebesar -6,59 kkal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 14,74µm. Hal ini menunjukkan bahwa metode *docking* yang digunakan telah valid dan pengaturan parameter yang digunakan memenuhi kriteria validasi, sehingga parameter tersebut dapat digunakan selanjutnya untuk melakukan *docking* pada senyawa uji.

Pada gambar 3, terdapat 2 struktur ligan yang saling tumpang tindih antara *native ligand* yang sebelum *redocking* (hijau) dan hasil setelah *redocking* (biru) yang mana keduanya adalah *native ligand trimethoprim*.



Gambar 4. Hasil Validasi Interaksi native ligand pada reseptor Dihydrofolate reductase dalam 2D

Berdasarkan gambar 4 dapat dilihat bahwa ikatan yang terjadi antara *native ligand trimethoprim* dengan reseptor *Dihydrofolate reductase* membentuk dua jenis ikatan yaitu ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen, namun ikatan yang paling banyak

muncul adalah ikatan hidrofobik yang digambarkan dengan garis putus-putus berwarna ungu yang terdiri dari ALA7, TRP6, ILE5 dan PHE31. Selain itu *trimethoprim* membentuk ikatan hidrogen yang digambarkan dengan garis putus-putus berwarna hijau yang terdiri dari THR113 dan ASP27.

Molecular docking senyawa uji

Dalam penelitian ini pengujian *molecular docking* dilakukan terhadap 16 senyawa dari tanaman sambiloto yang telah lulus uji toksisitas. *Molecular docking* dilakukan menggunakan *software Autodock Tools* dan di visualisasi menggunakan *software Discovery Studio 2016*.

Hasil validasi *docking* pada *native ligand* yaitu *trimethoprim* menjadi acuan untuk ligan pembanding dan ligan uji dalam menentukan senyawa yang paling berpotensi untuk pengobatan tuberkulosis. Proses *docking* pada ligan uji dilakukan dengan cara yang sama seperti proses

validasi dengan menggunakan ukuran dan posisi *grid box* yang sama dengan *native ligand*.

Parameter yang digunakan pada proses *molecular docking* yaitu nilai *binding energy* (ΔG), konstanta inhibisi (KI), residu asam amino dan jumlah interaksi ikatan yang terbentuk (Syahputra *et al.*, 2022).

Nilai *binding energy* dijadikan sebagai parameter kestabilan proses *docking*, semakin negatif nilai ikatan energi bebas menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara ligan dan protein target, sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat (Aswad *et al.*, 2020). Jika semakin kecil nilai ΔG dan nilai Ki, hal ini menunjukkan bahwa afinitas ligan yang dimiliki semakin tinggi. Ligan uji dengan residu asam amino dan ikatan hidrogen yang mendekati ligan alami dengan kemiripan jenis interaksi menggambarkan bahwa ligan uji tersebut memiliki aktivitas yang sama dengan ligan alami (Pratama, 2016).

Tabel 10. Hasil Molecular Docking Senyawa Uji

No.	Nama Senyawa/Ligan uji	RMSD (Å)	Energi Ikatan $\Delta G(\text{kcal/mol})$	Konstanta inhibisi (μm)	Asam Amino	Jenis Ikatan
1.	<i>Trimethoprim</i> (<i>native ligand</i>)	0.521	-6.59	14.74 μm	THR113 ASP27	Ikatan Hidrogen
					ALA7 TRP6 ILE5 PHE31	Ikatan Hidrofobik
2.	<i>Deoxyandrographolide</i>	3.193	-7.20	5.28 μM	TRP6	Ikatan Hidrogen
					ALA7 ILE14 PHE31 ILE94 LEU50 LEU57 ILE20	Ikatan Hidrofobik
3.	<i>7-O-Methylwogonin</i>	1.492	-6.59	14.84 μM	ALA7 ILE5	Ikatan Hidrofobik

No.	Nama Senyawa/Ligan uji	RMSD (Å)	Energi Ikatan $\Delta G(\text{kcal/mol})$	Konstanta inhibisi (μM)	Asam Amino	Jenis Ikatan
					PHE31 ILE94	
4.	1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene	5.465	-4.96	230.24 μM	ILE5 ILE14 ALA7 PHE31	Ikatan Hidrofobik
5.	Andrographolactone	3.372	-6.94	8.13 μM	LEU50 ILE94 ILE20 ILE5 HIS30 ALA7 PHE31	Ikatan Hidrofobik
6.	Andrographic acid	2.392	-5.90	47.31 μM	TYR100 TRP6 ILE94	Ikatan Hidrogen
					ILE20 PHE31 LEU57	Ikatan Hidrofobik
7.	Ethyl paraben	2.319	-4.26	754.09 μM	ALA7	Ikatan Hidrogen
					ILE5 HIS30 PHE31 ILE94	Ikatan Hidrofobik
8.	Methyl palmitoleate	1.872	-4.39	608.88 μM	ASP27	Ikatan Hidrogen
					PHE31 ILE5 ALA7	Ikatan Hidrofobik
9.	* (E)-[X]-prop-2-enoic acid	1.634	-6.51	17.02 μM	ILE20 PHE31 ILE5 ILE94 LEU50	Ikatan Hidrofobik
10.	5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	3.795	-6.66	13.22 μM	ALA7 TRP6	Ikatan Hidrogen
					PHE31 LEU57 ILE94	Ikatan Hidrofobik
11.	Apigenin	1.432	-5.80	55.87 μM	ASP27	Ikatan Hidrogen
					ILE5 ALA7 PHE31 LEU50 ILE94	Ikatan Hidrofobik
12.	Wogonin	1.282	-6.49	17.53 μM	ILE94 PHE31 ALA7 ILE5	Ikatan Hidrofobik

No.	Nama Senyawa/Ligan uji	RMSD (Å)	Energi Ikatan $\Delta G(\text{kcal/mol})$	Konstanta inhibisi (μM)	Asam Amino	Jenis Ikatan
13.	<i>Isoswertisin</i>	3.297	-4.98	224.48 μM	PHE31 ALA7	Ikatan Hidrofobik
14.	<i>Cosmosiin</i>	3.544	-2.93	7.12 mM	ASP27	Ikatan Hidrogen
					ILE94 PHE31 ILE5 ALA7	Ikatan Hidrofobik
15.	<i>Procumbide</i>	2.493	-6.42	19.52 μM	PHE31 ILE94 ILE5 GLN28	Ikatan Hidrogen
					PHE31	Ikatan Hidrofobik
16.	<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	3.021	-3.30	3.78 mM	ALA7	Ikatan Hidrogen
					ALA7	Ikatan Hidrofobik
17.	<i>Cinnamic acid</i>	3.652	-3.82	1.59 mM	ILE94 PHE31	Ikatan Hidrofobik

Dari hasil analisis pada tabel 10 menunjukkan bahwa hasil *molecular docking* pada senyawa uji dari sambiloto yang memiliki nilai RMSD <2 Å bahkan mendekati hasil dari *native ligand* yaitu senyawa wogonin dengan nilai RMSD yang diperoleh yaitu 1,282 Å, senyawa tersebut dianggap telah lulus uji *molecular docking*. Dari 16 senyawa terdapat 3 senyawa yang memiliki nilai *binding energy* dan konstanta inhibisi yang sama bahkan mendekati hasil *native ligand* yaitu 7-O-Methylwogonin dan apigenin sehingga ketiga senyawa tersebut dapat dikatakan senyawa yang paling baik diantara 16 senyawa yang diujikan.

Tahapan selanjutnya adalah melakukan visualisasi dan analisis

interaksi hasil *docking* dalam struktur ikatan 2D antara ligan uji dengan reseptor *Dihydrofolate reductase*. Hasil visualisasi ini berupa interaksi residu asam amino dengan ligan. Adanya interaksi asam amino yang terlibat memungkinkan adanya kontak antara ligan dengan reseptor *Dihydrofolate reductase*.

Analisis Data

Sebagai *native ligand*, *trimethoprim* menjadi acuan bagi ligan uji untuk menentukan seberapa baik ligan uji dapat dijadikan kandidat obat. Jenis ikatan dan posisi ikatan yang menyerupai *trimethoprim* disertai dengan nilai BA yang semakin rendah dianggap memiliki potensi yang lebih baik dalam menghambat kerja enzim *Dihydrofolate reductase*.

Nilai ligan uji dengan RMSD terendah adalah senyawa *wogonin* sebesar 1.282 Å dengan nilai energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi

berturut-turut sebesar -6,49 kkal/mol; dan 17,53 μm .

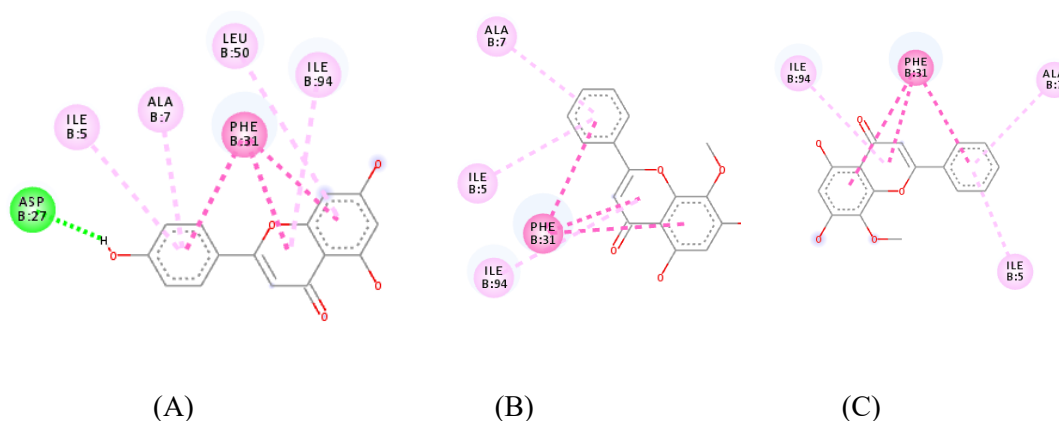
Nilai energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi yang mendekati dengan hasil *native ligand* yaitu 7-*O-methylwogonin* dan *apigenin* dengan nilai energi bebas dan konstanta inhibisi berturut-turut sebesar -6,59 kkal/mol, -5,80 kkal/mol dan 14,84 μm , 55,87 μm .

Besarnya nilai RMSD dan energi ikatan saja tidak cukup untuk melihat efektivitas suatu obat. Obat dapat bekerja dengan optimal ketika terjadi ikatan yang tepat antara ligan dengan reseptornya. Ikatan yang tepat tidak hanya dilihat dari besarnya energi afinitas ikatan, tetapi juga perlu memperhatikan jenis ikatan dan posisi ikatan yang terjadi.

Trimethoprim sebagai *native ligand* memiliki 2 ikatan hidrogen dan 4 ikatan hidrofobik dalam 6 residu asam

amino yaitu ALA7, TRP6, ILE5, PHE31, THR113 dan ASP27 menjadi residu utama yang diduga berperan dalam proses penghambatan aktivitas pada sisi aktif. Oleh karena itu, senyawa dari sambiloto yang memiliki interaksi dengan beberapa residu asam amino diprediksi dapat memberikan aktivitas penghambatan pada protein target.

Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang kuat dibandingkan dengan ikatan *Van der Waals*. Hal ini disebabkan karena ikatan hidrogen dapat terbentuk meskipun jarak antara ligan dan reseptor cukup jauh. Interaksi hidrofobik juga berperan dalam menentukan stabilitas ligan terhadap reseptor. Adanya pembentukan ikatan hidrofobik yaitu untuk meminimalkan interaksi residu nonpolar dengan air (Frimayanti *et al.*, 2021).



Gambar 5. Visualisasi 2D Interaksi (A) Senyawa *apigenin*, (B) 7-*O-methylwogonin*, (C) *wogonin* pada reseptor *Dihydrofolate reductase*

Berdasarkan visualisasi hasil *docking* senyawa *apigenin* memiliki 1 jenis ikatan hidrogen dan residu asam amino yang sama dengan *native ligand* yaitu ASP27 melalui ikatan hidrogen, ILE5, ALA7, PHE31 melalui ikatan hidrofobik. 7-*O-methylwogonin* dan *wogonin* memiliki residu asam amino

dan jenis ikatan yang sama yaitu hidrofobik diantaranya ALA7, ILE5, PHE31.

Pada ketiga senyawa tersebut menunjukkan jumlah kecocokan terbanyak dari beberapa residu asam amino yang sama dengan *native ligand* (*trimethoprim*). Namun, ikatan

hidrogen yang terbentuk hanya pada senyawa *apigenin* sebanyak satu ikatan. Semakin banyak ikatan hidrogen yang terbentuk diprediksi dapat meningkatkan aktivitas ligan sebagai *inhibitor Dihydrofolate reductase*.

Dengan demikian senyawa *apigenin*, *7-O-methylwogonin* dan *wogonin* memiliki aktivitas sebagai penghambat pada reseptor *Dihydrofolate reductase* dengan mekanisme yang sama seperti kontrol positif (*native ligand*).

KESIMPULAN

1. Hasil analisis *docking* dari 16 senyawa uji tanaman sambiloto terdapat 3 senyawa uji yang paling berpotensi sebagai antituberkulosis terhadap reseptor *Dihydrofolate reductase* yaitu senyawa *apigenin*, *7-O-methylwogonin* dan *wogonin*.
2. Jika dibandingkan efektivitas senyawa uji dengan ligan pembanding hasilnya menunjukkan bahwa ligan pembanding (*trimethoprim*) memiliki nilai energi bebas, Ki dan RMSD yang lebih rendah daripada senyawa uji pada tanaman sambiloto.
3. Senyawa *apigenin*, *7-O-methylwogonin* dan *wogonin* memiliki kemiripan asam amino yang paling banyak dan ikatan hidrogen yang sama dengan ligan pembanding dibandingkan senyawa uji lain, yaitu ALA7, ILE5, PHE31 dan 1 ikatan hidrogen ASP27.

SARAN

Hasil penelitian yang diperoleh merupakan prediksi dari simulasi komputerisasi, sehingga perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kestabilan interaksi antara ligan dan reseptor dari senyawa tanaman sambiloto dengan aktivitas

terbaik yaitu *apigenin*, *7-O-methylwogonin* dan *wogonin* yang dapat menghambat kerja reseptor *Dihydrofolate reductase* agar bisa dijadikan sebagai alternatif dalam pengobatan TBC.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, S. S., Putra, P. P., Antasionasti, I., Rundengan, G., Suoth, E. J., Abdullah, R. P. I., & Abdullah, F. (2021). Analisis Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik Dan Toksikologi Pada Pericarpium Pala (*Myristica fragrans*) Secara Artificial Intelligence. *Chemistry Progress*, 14(2), 81. <https://doi.org/10.35799/cp.14.2.2021.37112>
- Adriani. (2018). Prediksi Senyawa Bioaktif Dari Tanaman Sanrego (*Lunasia amara* Blanco) Sebagai Inhibitor Enzim Siklooksigenase-2 (Cox-2) Melalui Pendekatan Molecular Docking. *Jurnal Ilmiah Pena*, 1.
- Aragaw, W. W., Lee, B. M., Yang, X., Zimmerman, M. D., Gengenbacher, M., Dartois, V., Chui, W.-K., Jackson, C. J., & Dick, T. (2021). Potency boost of a *Mycobacterium tuberculosis* Dihydrofolate reductase inhibitor by multienzyme F 420 H 2-dependent reduction. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025172118/-/DCSupplemental>
- Aswad, M., Christine, L., Nursamsiar, N., & Hardianti, B. (2020). Studi Penambatan Molekul Senyawa-Senyawa Bioaktif Dari Kulit Akar Murbei (*Morus* Sp.) Terhadap Reseptor TNF- α . *Majalah Farmasi Dan Farmakologi*, 23(3), 85–100. <https://doi.org/10.20956/mff.v23i3.9399>
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018).

- ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>
- Cheng, F., Yu, Y., Shen, J., Yang, L., Li, W., Liu, G., Lee, P. W., & Tang, Y. (2011). *Classification of cytochrome P450 inhibitors and noninhibitors using combined classifiers. Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(5), 996–1011. <https://doi.org/10.1021/ci200028n>
- Esteves, F., Rueff, J., & Kranendonk, M. (2021). *The central role of cytochrome p450 in xenobiotic metabolism—a brief review on a fascinating enzyme family. In Journal of Xenobiotics* (Vol. 11, Issue 3, pp. 94–114). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jox11030007>
- Fauzan, Z. M., Ismail, H., Nasrullah Muhammad Farmasi, H., & Tinggi Farmasi Bandung, S. (2019). *Studi Molecular Docking...* (Vol. 2, Issue 1).
- Follman, K. E., & Morris, M. E. (2018). *Prediction of the Effects of Renal Impairment on Clearance for Organic Cation Drugs that Undergo Renal Secretion: A Simulation-Based Study. Drug Metabolism and Disposition*, 46(5), 758–769. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.079558>
- Frimayanti, N., Lukman, A., Nathania, L., Program, S., Farmasi, F., Farmasi, S., Tingi, I., & Farmasi, R. (2021). *Studi molecular docking senyawa 1,5-benzothiazepine sebagai inhibitor dengue DEN-2 NS2B/NS3 serine protease. Chempublish Journal*, 6(1), 54–62. <https://doi.org/10.22437/chp.v6i1.12980>
- Frimayanti, N., Mora, E., Anugrah, R., Tinggi, S., Riau, I. F., Kamboja, J., & Simpang Baru, P. (2018). *Study of Molecular Docking of Chalcone Analogue Compounds as Inhibitors for Liver Cancer Cells HEPG2. Computer Engineering and Applications*, 7(2). www.pdb.org
- Hossain, S., Urbi, Z., Karuniawati, H., Mohiuddin, R. B., Qrimida, A. M., Allzrag, A. M. M., Ming, L. C., Pagano, E., & Capasso, R. (2021). *Andrographis paniculata* (Burm. f.) wall. ex nees: *An updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. In Life* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11040348>
- Kemenkes RI. (2019). Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia.
- Paramitha, M. D., & Rahamanisa, S. (2016). Ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antidiabetik terhadap mencit wistar terinduksi aloksan.
- Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- Pratama, F. (2016). *Studi Docking Molekular Senyawa Turunan Kuinolin Terhadap Reseptor Estrogen-α Mohammad Rizki Fadhil Pratama. In Jurnal Surya Medika* (Vol. 2, Issue 1). www.rscb.org.
- Rachmania, R. A., Supandi, & Cristina, A. D. F. (2016). Analisis

- Penambatan Molekul Senyawa Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Pada Reseptor α -Glukosidase Sebagai Antidiabetes. 13.
- Riyaldi, M. R., Fatiya, N. U., F Dipadharma, R. H., Kusnadi, I. F., Hidayat, S., & Suhandi, C. (2022). Studi In-Silico Senyawa Pada Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Sebagai *Inhibitor* Neuraminidase Pada Influenza. <http://www.swissadme.ch/index.php>
- Sari, I. W., Junaidin, J., & Pratiwi, D. (2020). Studi *Molecular Docking* Senyawa Flavonoid Herba Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) Pada Reseptor A-Glukosidase Sebagai Antidiabetes Tipe 2. *Jurnal Farmagazine*, 7(2), 54. <https://doi.org/10.47653/farm.v7i2.194>
- Sukmawaty, E., Susanti, S., & Masriany, M. (2021). Penambatan Molekuler Senyawa Cendawan Endofit *Trichoderma sp.* Sebagai *Inhibitor Protein Low Density Lipoprotein*, Enzim Lanasterol 14 Demetilase dan Lipase yang Bertanggung Jawab dalam Dermatitis Seboroik. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, 6(1), 98–107. <https://doi.org/10.36387/jiis.v6i1.636>
- Syahputra, Ambarsari, L., & Sumaryada, T. (2014). Simulasi *Docking* Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya sebagai *Inhibitor* Enzim 12-Lipoksigenase.
- Syahputra, R., Utami, D., Widyaningsih, W., Dahlan, A., Soepomo, J., Janturan, S., Farmakologi dan Farmasi Klinik, D., & Ahmad Dahlan, U. (2022). Studi *Docking* Molekuler Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) In *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia* (Vol. 19, Issue 1). <http://pubchem.ncbi.n>
- Vilchèze, C., & Jacobs, W. R. (2012). *The combination of sulfamethoxazole, trimethoprim, and isoniazid or rifampin is bactericidal and prevents the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5142–5148. <https://doi.org/10.1128/AAC.00832-12>
- World Health Organization. (2020). *Global tuberculosis report 2020. World Health Organization.*
- Wróbel, A., Arciszewska, K., Maliszewski, D., & Drozdowska, D. (2020). *Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of Dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. In Journal of Antibiotics* (Vol. 73, Issue 1, pp. 5–27). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0240-6>