

STUDI IN-SILICO SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness.) TERHADAP TARGET AKSI XANTHIN OKSIDASE

Tarisyapobela

¹Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Institut Kesehatan dan Teknologi Graha Medika

*Corresponding Author: tarisyapobela@gmail.com.

ABSTRAK

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) berpotensi dalam menurunkan kadar asam urat serta dapat menghambat pembentukan xanthin oksidase oleh kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman tersebut. Dimana penggunaan sambiloto lebih efektif karena minim efek samping dibandingkan dengan penggunaan obat sintetik seperti NSAID, kortikosteroid, kolkisin, dan inhibitor xanthin oksidase yang dapat menimbulkan efek samping dalam penggunaan jangka panjang seperti kemerahan pada kulit, necrosis hepatic, leukopenia, dan juga menimbulkan toksisitas pada gastrointestinal. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui apakah senyawa aktif tanaman sambiloto berpotensi sebagai obat untuk menurunkan kadar asam urat dengan menghambat enzim xanthin oksidase, menggunakan metode studi *In Silico* secara penambatan *molecular* dengan menggunakan aplikasi Autodock 4.0. Aktivitas senyawa tanaman sambiloto terhadap enzim xanthin oksidase dapat dilihat melalui nilai energi ikatan (ΔG), konstanta inhibisi (K_i), interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen yang terbentuk serta residu asam amino yang terikat. Ukuran pusat penambatan (*grid box*) pada penelitian ini yaitu $x = 29.104$; $y = 12.538$ dan $z = 190.589$ dengan volume $x,y,z = 40$. Hasil simulasi *docking molecular* diperoleh 4 senyawa uji terbaik yaitu Neoandrographolide yang memiliki nilai energi ikatan (ΔG) sebesar -10.76 dengan konstanta inhibisi (K_i) 12.90, Deoxyandrographolide memiliki nilai ΔG -9,70 dan K_i 78.04, Andrographolide dengan nilai ΔG -9.61 dan K_i 90.48, dan senyawa 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide dengan nilai ΔG -9.55 dan K_i 100.70. Kesimpulan dari penelitian ini ialah terdapat empat senyawa tersebut yang memiliki interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen yang sama dengan native ligan sehingga diduga mempunyai potensi terhadap xanthin oksidase.

Kata Kunci: *Andrographis paniculata*, *Docking Molecular*, Xanthin Oksidase,

ABSTRACT

The sambiloto plant (*Andrographis paniculata* Ness.) has the potential to reduce uric acid levels and can inhibit the formation of xanthin oxidase by the content of secondary metabolites contained in the plant. Where the use of sambiloto is more effective because it has minimal side effects compared to the use of synthetic drugs such as NSAIDs, corticosteroids, colchicine, and xanthin oxidase inhibitors which can cause side effects in long-term use such as skin redness, hepatic necrosis, leukopenia, and also cause gastrointestinal toxicity. The purpose of this study is to determine whether the active compounds of the sambiloto plant have the potential as a drug to reduce uric acid levels by inhibiting the xanthin oxidase enzyme, using the In Silico study method by molecular tethering using the Autodock 4.0 application. The activity of sambiloto plant compounds against xanthin oxidase enzyme can be seen through the value of binding energy (ΔG), inhibition constant (K_i), hydrophobic interactions and hydrogen bonds formed as well as bound amino acid residues. The size of the tethering center (grid box) in this study is $x = 29,104$; $y = 12,538$ and $z = 190,589$ with a volume of $x,y,z = 40$. The results of molecular docking simulations obtained 4 best test compounds, namely Neoandrographolide which has a bond energy value (ΔG) of -10.76 with an inhibition constant (K_i) of 12.90, Deoxyandrographolide has a ΔG value of -9.70 and K_i 78.04, Andrographolide with n -9.70 and K_i 78.04. The conclusion of this research is that there are four compounds that have the same hydrophobic interactions and hydrogen bonds with native ligands so that they are thought to have potential against xanthin oxidase.

Keywords: *Andrographis paniculata*, Docking Molecular, Xanthin Oksidase,

PENDAHULUAN

Hiperurisemia merupakan suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat serum di atas batas normal. Kadar asam urat pada pria normalnya di bawah 7 mg/dl, sebelum masa pubertas sekitar 3,5 mg/dl, dan setelah pubertas biasanya meningkat hingga 5,2 mg/dl. Sedangkan kadar asam urat pada perempuan berkisar antara 2,0-6,6 mg/dl (Wulandari & Sumarmin, 2018). Asam urat (Gout) terjadi karena adanya pengkristalan atau deposisi kristal monosodium urat pada jaringan sebagai akibat gangguan metabolisme berupa hiperurisemia. Hiperurisemia sudah lama ditetapkan sebagai faktor etiologi utama dalam gout. Faktor usia diatas 40 tahun dapat mempengaruhi asam urat, hal ini disebabkan oleh kadar asam urat pada laki-laki cenderung meningkat seiring bertambahnya usia (Handayani, 2017).

Prevalensi penderita asam urat di negara barat lebih tinggi pada laki-laki, peristiwa tersebut berhubungan dengan hormon

esterogen. Hormon tersebut berperan dalam membantu mengeluarkan asam urat melalui urin, pria tidak mempunyai hormon estrogen yang tinggi sehingga asam urat sulit diekskresikan melalui urin, dibandingkan perempuan sebesar 3-6 %, karena asam urat pada wanita meningkat ketika memasuki masa menopause karena kadar estrogen dalam tubuhnya juga sudah menurun. Prevalensi dapat meningkat 10 % pada laki-laki dan 6 % pada perempuan di beberapa negara dengan rentang usia ≥ 80 tahun. Insiden tahunan gout 2,68 per 1000 orang. Berdasarkan data di Amerika Serikat didapatkan 5,7 juta orang mengalami asam urat. Di Indonesia, prevalensi penyakit asam urat berkisar pada 45 % pada usia 55-64 tahun dan 65-74 tahun, menurut data dari world health organization dalam non-communicable disease country profil berkisar pada 51,9 %, serta usia >75 tahun berkisar pada 54,8 %. Prevalensi hiperurisemia di Indonesia menduduki

urutan kedua setelah osteoarthritis (Yasin *et al.*, 2023).

Penumpukan kadar asam urat dapat menyebabkan pembentukan kristal monosodium urat dalam tubuh yang menyebabkan gangguan peradangan pada area persendian. Akibatnya persendian mengalami pembengkakan, nyeri, panas dan kaku. Sendi-sendi yang diserang terutama ialah jari-jari kaki, tumit, pergelangan tangan, jari tangan dan siku. Penyakit asam urat (gout) disebabkan karena ketidakmampuan ginjal untuk mengeluarkan asam urat dari tubuh sepenuhnya melalui urine. Sebagian kecil lainnya ialah karena tubuh memproduksi asam urat secara berlebihan. Asam urat merupakan hasil akhir dari metabolisme purin pada tubuh manusia. Purin merupakan senyawa amina bagian protein yang menyusun tubuh. Asam urat ialah senyawa yang sulit larut dalam air dan akan menumpuk diberbagai tempat seperti ginjal dan sendi. Asam urat masuk ke plasma darah, cairan sinovial, hati, dan beberapa organ lainnya. Selanjutnya(Sayekti, 2021). Pada proses pencernaan purin ada zat kimia yang dikenal sebagai enzim *Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase* (HGPRT). Enzim ini berperan dalam mengubah purin menjadi nukleotida purin untuk digunakan kembali sebagai kpmponen DNA. Ketika enzim HGPRT mengalami defisiensi, maka purin akan dimetabolisme oleh enzim xantin oksidase menjadi asam urat (Hermansyah *et al.*,2022).

Xanthin oksidase mampu mengkatalisis oksidasi hipoxanthin menjadi xanthin dan mengkatalisis xanthin menjadi asam urat. Asam urat tersebut terjadi akibat peningkatan produksi asam urat melalui mekanisme ini (Rohmat & Herdyastuti, 2021). Banyak obat-obat yang telah ditemukan untuk menghambat pembentukan asam urat. Terdapat beberapa golongan obat yang sering digunakan untuk terapi oral pada penyakit hiperurisemia yaitu NSAID, Kortikosteroid, kolkisin, dan Inhibitor

Xanthin Oksidase. Penggunaan beberapa golongan obat ini bertujuan untuk menurunkan sintesis asam urat dan dapat mencegah oksidasi hipoxanthin pada xanthin oksidase sehingga produksi asam urat dapat menurun (Muthiah *et al.*, 2020). Akan tetapi penggunaan obat tersebut dalam jangka waktu yang panjang akan menyebabkan beberapa efek samping seperti kemerahan pada kulit, necrosis hepatic, leukopenia, dan kadang-kadang terjadi toksisitas pada gastrointestinal (Wulandari dan Sumarmin, 2018).

Berkaitan dengan efek samping yang sering muncul dari obat-obatan sintetik sebagai inhibitor enzim xantin oksidase pada asam urat, maka beberapa penelitian dengan menggunakan bahan alam juga telah dilakukan untuk menghentikan aktivitas enzim xanthin oksidase. Bahan alam mempunyai kelebihan yaitu efek sampingnya cenderung lebih sedikit meskipun digunakan dalam waktu yang lama, sehingga lebih aman digunakan dibandingkan dengan obat sintetik. Bahan alam yang dapat digunakan yaitu tanaman yang mengandung senyawa kimia dimana dapat berpotensi sebagai inhibitor aktivitas enzim xantin oksidase (Hermansyah *et al.*, 2022). Salah satu tanaman yang digunakan adalah Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.).

Sambiloto merupakan salah satu tanaman yang mudah didapatkan dan secara luas dikenal baik dikalangan pengguna tanaman obat, pengelola jamu, pengobatan tradisional dan peneliti tanaman obat maupun dalam kalangan masyarakat umum. Andrographolide merupakan senyawa yang sangat umum dan banyak terkandung dalam tanaman sambiloto yaitu sekitar 4 %. Selain itu, terdapat sejumlah senyawa lain seperti asam kafeat, β -Sitosterol, 14-deoxyandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydrographolid, 5-hydroxy-7, asam oleonat-8-dimetoksiflavin, dan neoandrographolide (Bahi *et al.*, 2020).

Selain itu terdapat senyawa yang berpotensi untuk mengurangi kadar asam urat dalam darah dan juga menghentikan aktivitas xanthin yaitu senyawa flavonoid golongan flavon atau flavonol yang berasal dari ekstrak etanol dalam akar dan daun sambiloto (Wulandari dan Sumarmin, 2018).

Ekstrak tanaman sambiloto efektif dalam menghambat dan menurunkan kadar asam urat, dimana kemampuan terhadap penghambatan pembentukan xanthin oksidase dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman sambiloto. Menurut penelitian Rahmi *et al* (2022) berdasarkan pengujian in-vitro ekstrak etanol sambiloto (80 %) dan andrografolida secara signifikan dapat menghambat xantin oksidase dan memiliki aktivitas antiinflamasi yang diuji dengan *Human Fibroblast-like Synoviocyte* (HFLS), ekstrak etanol dan andrografolida efektif menurunkan produksi empat sitokin IL-1 α , IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , serta menghambat sintesis MyD88, NLRP3, NF-K κ B p65, dan caspase-1 pada tikus yang diisolasi. Selain itu, pengujian secara in-vivo menunjukkan bahwa ekstrak etanol (200 mg/kg) menurunkan kadar asam urat sebesar 17.01 $\pm$ 0.64 mg/dl menjadi 2.39 $\pm$ 0.59 mg/dl dan andrografolida (30 mg/kg) 19.79 $\pm$ 0.61mg/dl menjadi 2.31 $\pm$ 0.51mg/dl yang diberikan secara oral pada tikus yang telah diinduksi monosodium urate (MSU) mengalami penurunan kadar asam urat (Rahmi *et al.*, 2022).

Penelitian-penelitian di atas menunjukkan bahwa tanaman sambiloto mempunyai kandungan senyawa yang dapat digunakan untuk mengurangi kadar asam urat pada kondisi hiperurisemia. Sambiloto terdapat beberapa senyawa yang memiliki daya hambat pada xantin oksidase yang dapat dijadikan sebagai senyawa penuntun dalam pengembangan suatu obat. Tetapi zat aktif yang bertanggung jawab dalam penghambatan terhadap xantin oksidase pada penyakit hiperurisemia belum

diketahui dengan pasti. Pengembangan sambiloto pada penyakit hiperurisemia membutuhkan waktu yang cukup lama dan biaya yang cukup besar, sehingga dengan adanya teknologi informasi maka digunakan metode *molecular docking* berbasis struktur *in silico* untuk mencari calon obat baru dengan menggunakan komputer.

Studi *In silico* merupakan suatu metode dengan menggunakan program tertentu untuk menggabungkan kondisi keadaan nyata ke dalam simulasi komputer untuk merancang obat baru. *In silico* ialah Metode yang sangat menjanjikan untuk mengetahui senyawa-senyawa baru karena lebih cepat dan lebih hemat biaya. Uji *in silico* dapat dilakukan dengan *molecular dockig*. Molekular doking dalam penemuan obat bertujuan untuk mengidentifikasi kedudukan molekul kecil yang inovatif dan untuk menunjukkan afinitas pengikatan yang tinggi serta selektivitas pada ligan uji (Amanda, 2021).

Metode *molecular docking* menggunakan aplikasi *Autodock*, *Gold*, *PyRx*, dan *OEDocking*. Dalam penelitian ini dilakukan *molecular docking* berbasis struktur *in silico* dengan menggunakan aplikasi *Autodock*. *Autodock* bekerja dengan cara mengevaluasi energi bebas, torsional bebas dari konformasi ikatan yang terbentuk antara enzim dan ligan berdasarkan energi *forcefield* pada algoritma, serta kekuatan kompleks ligan-protein yang terbentuk. Aplikasi *Autodock* ini dapat dengan mudah memisahkan senyawa dengan konstanta pengikatan mikromolar dengan mudah. Selain itu, aplikasi *Autodock* mempunyai kelebihan yaitu akurat, hemat biaya dan sangat cepat. Dibandingkan dengan beberapa aplikasi lainnya ialah memerlukan biaya yang lebih mahal (Noviardi dan Fachrurrazie, 2015).

METODE

Pada penelitian ini, dilakukan penambatan menggunakan makromolekul xanthin oksidase dengan kode PDB 2E1Q

(<https://www.rcsb.org/structure/2E1Q>).

senyawa uji (ligan uji) yang digunakan diperoleh dari data senyawa kimia yang terkandung pada tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.). Rancangan penelitian ini berupa eksploratif dengan menggunakan perangkat keras *personal computer* Axio MyPC One Pro K5-24(8n2-3) dengan spesifikasi Processor Intel® i5-1135G7 (Cache 6 MB, 3 GHz up to 4.10 GHz), RAM 8 GB DDR4 Memory, Tipe Grafis (Intel UHD Graphics) dan OS (Microsoft Windows 10 Pro) dan perangkat lunak Autodock 4.0, Pymol, *Discovery Studio Visualizer* serta aplikasi VegaZZ.

Bahan-bahan yang digunakan adalah nama IUPAC dari ligan uji yang diperoleh dari PubChem dan struktur 3D makromolekul xanthin oksidase dengan kode PDB 2E1Q yang diunduh dari Protein Data Bank (PDB).

Persiapan Senyawa Uji

Senyawa tanaman sambiloto yang akan dijadikan ligan uji diperoleh dari situs website Pubchem dengan memperoleh nama SMILES kandungan senyawa sambiloto dan dibuat struktur 3D-nya menggunakan aplikasi VegaZZ.

Preparasi Reseptor

Reseptor yang digunakan ialah xanthin oksidase yang di unduh di database Protein Data Bank dengan kode PDB 2E1Q, yang berada dalam bentuk makromolekul protein yang dipisahkan dari molekul lain yang tidak diinginkan dan dioptimasi menggunakan Autodock Tools untuk penambahan compute gastiger dan atom hidrogen.

Validasi Metode Dan Docking Moleculer

Validasi dilakukan dengan cara redocking ligan alami dengan reseptor xanthin oksidase yang sudah dipreparasi

Saat validasi metode *docking molecular* yang harus diperhatikan ialah nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) yang dianggap valid jika nilai RMSD tersebut $\leq 2,5 \text{ \AA}$.

Preparasi Ligan Uji

Ligan yang digunakan yaitu senyawa aktif tanaman sambiloto sebagai ligan uji dalam bentuk struktur 3D. Dilakukan menggunakan Autodock Tools untuk menambahkan muatan atom hidrogen dan muatan pada ligan.

Analisa dan Visualisasi

Docking molecular dilakukan dengan menggunakan Autodock 4.0 dan hasil *docking* tersebut divisualisasikan menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer* untuk melihat ikatan hidrogen dan ikatan dengan residu asam amino yang terbentuk. Parameter yang diamati ialah energi ikatan (ΔG), konstanta inhibisi (K_i), interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen, kesesuaian residu asam amino yang terbentuk antara ligan dengan reseptor pada ligan alami sebagai ligan pembanding.

HASIL

Validasi Metode Docking

Validasi metode *docking molecular* dilakukan dengan menggunakan aplikasi Autodock Tools (Autodock4). Dalam proses validasi diperlukan penentuan *gridbox* atau koordinat pusat tempat interaksi ligan dan protein. Pusat dimensi *gridbox* dari makromolekul yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 5.1.

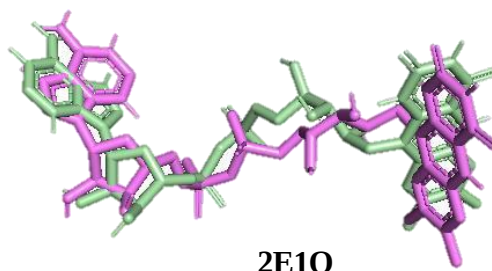
Tabel 5.1 Parameter Gridbox

Makromolekul	Gridbox						RMSD
	Center			Dimensi (Å)			
	x	y	Z	x	y	z	
2E1Q	29.104	12.538	190.589	40	40	58	2.102 Å

Hasil validasi diperoleh nilai RMSD 2.102 Å yang dilakukan dengan metode redocking antara native ligan dan protein xanthin oksidase dimana menunjukkan posisi atau konformasi dari ligan hasil validasi tidak berbeda jauh dengan posisi ligan hasil kristalografi. Hal tersebut dikarenakan nilai nilai RMSD < 2.5 Å, sehingga terlihat adanya tumpang tindih antara ligan hasil validasi dan ligan hasil kristalografi. Gambar 5.1 menunjukkan visualisasi ligan alami hasil validasi dan hasil kristalografi menggunakan pymol.

Penambatan ligan dan makromolekul

Pada penelitian ini 8 kandungan kimia senyawa aktif dalam sambiloto ditambatkan pada target aksi xanthin oksidase. Penambatan ligan dan makromolekul dilakukan secara *in-silico* dengan menggunakan aplikasi Autodock 4. Penambatan molekul bertujuan untuk memprediksi nilai mengenai hubungan pengikatan yang akan dimiliki antara ligan dan reseptor (Asnawi *et al.*, 2023). Hasil dari penambatan ligan dan makromolekul dapat dilihat pada tabel 5.2.



2E1Q

Gambar 5.1 Hasil overlay ligan alami (ungu) dan ligan redocked (hijau)

Tabel 5.2 Nilai scoring senyawa uji dari sambiloto pada reseptor xanthin oksidase

No	Ligan	Energi Ikatan (kKal/mol)	Konstanta Inhibisi (μ M)
1	Ligan Alami	-10.27	29.80
2	Andrographin	-8.86	321.43
3	Alkane	-5.88	48.64
4	Neoandrographolide	-10.76	12.90
5	Deoxyandrographolide	-9.70	78.04
6	Andrographolid	-9.61	90.48
7	14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide	-9.55	100.70
8	Aldehid	-5.67	69.26
9	Panikulin	-8.83	336.80

Cetak tebal : 4 senyawa uji terbaik

Berdasarkan tabel diatas hasil energi ikatan (ΔG) yang diperoleh sangat bervariasi, dari 8 senyawa ligan uji yang berhasil ditambahkan didapatkan 4 senyawa uji yang terbaik yang memiliki energi ikatan lebih besar dari *native ligand* yaitu neoandrographolid dan senyawa uji yang memiliki nilai terendah dari *native ligand*-nya yaitu 14 - Deoxy - 11,12 – didehydroandrographolide, andrographolid, dan deoxyandrographolid, dimana 4 senyawa tersebut mampu berinteraksi dengan protein Xanthin Oksidase.

Visualisasi dari interaksi *docking* dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Biova Discovery Studio Visualization* untuk mengetahui hasil dari penambatan antara *native ligand* dengan ligan uji yang digunakan. Hasil visualisasi berupa residu asam amino, jika terdapat interaksi antara *native ligand* dengan ligan uji dapat dikatakan bahwa ligan uji tersebut memiliki aktivitas penghambatan. Tabel 5.3 menunjukkan hasil visualisasi 4 senyawa terbaik sambiloto dengan *native ligand*.

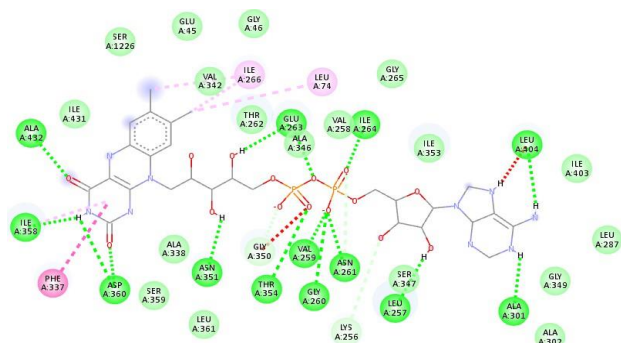
Tabel 5.3 Hasil visualisasi residu asam amino pada protein xanthin oksidase

Ligan	Residu asam amino yang terlibat dalam interaksi	
	Ikatan Hidrogen	Selain Ikatan Hidrogen
Ligan alami (oksipurinol)	Ala (A:432), Ile (A:358), Asp (A:360), Asn (A:351), Thr (A:354), Val (A:259), Gly (A:260), Asn (A:261), Leu (A:257), Ala (A:301), Glu (A:263), Ile (A:264), Leu (A:257).	Ala (A:338), Ser (A:359), Leu (A:361), Ile (A:431), Thr (A:262), Val (A:258), Ala (A:346), Ala (A:302), Ile (A:353), Leu (A:287), Ile (A:403), Gly (A:349), Ser (A:1226), Glu (A:45), Gly (A:46), Gly (A:265), Val (A:342), Gly (350), Lys (A:256), Phe (A:337), Ile (A:266) dan Leu (A:74).
Andrographolid	Glu (A:267), Ile (A:353), Thr (A:354) , Gly (A:260) , Ser (A:347).	Arg (A:394), Ala (A:355), Val (A:258) , Glu (A:263), Gly (A:350) , Asn (A:261), Ala (A:346) , Thr (A:262) , Asn (A:351), Lys (A:256) , Ile (A:264), Leu (A:257), Val (A:259).
Deoxyandrographolid	Glu (A:263) , Ile (A:264) , Ser (A:347), Gly (A:260) .	Ala (A:346) , Thr (A:262) , Asn (A:261), Gly (A:265) , Thr (A:354), Lys (A:256) , Gly (A:350) , Leu (A:404), Gly (A:349) , Ala (A:301), Val (A:258) , Val (A:259), Leu (A:257), Pro (A:281), Ile (A:353) .
14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid	Thr (A:262), Gly (A:260) , Ser (A:347), Val (A:259) .	Val (A:342) , Leu (A:305), Asn (A:351), Ile (A:266) , Glu (A:263), Thr (A:354), Asn (A:261), Gly (A:350) , Ala (A:338) , Phe (A:337) , Ala (A:346) , Val (A:258) , Ile (A:264).
Neoandrographolid	Val (A:259) , Gly (A:260) , Ser (A:347), Glu (A:263) , Arg (A:394).	Val (A:342) , Asp (A:360), Asn (A:351), Ser (A:359) , Thr (A:262) , Ile (A:266) , Val (A:258) , Asn (A:261), Gly (A:350) , Thr (A:354), Ser (A:356), Ile (A:358), Leu (A:305), Ala (A:346) , Ile (A:264), Phe (A:337) .

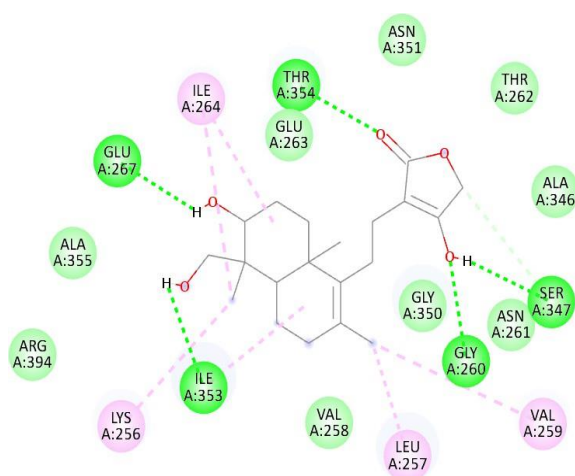
Cetak tebal : Kesamaan asam amino yang berinteraksi dengan *native ligand*.

Berdasarkan tabel di atas, dapat dilihat terdapat empat senyawa terbaik yang mempunyai interaksi hidrofobik dan kesamaan residu asam amino pada ikatan hidrogen yang sama dengan *native ligand* yaitu andrographolid, deoxyandrographolid, 14-

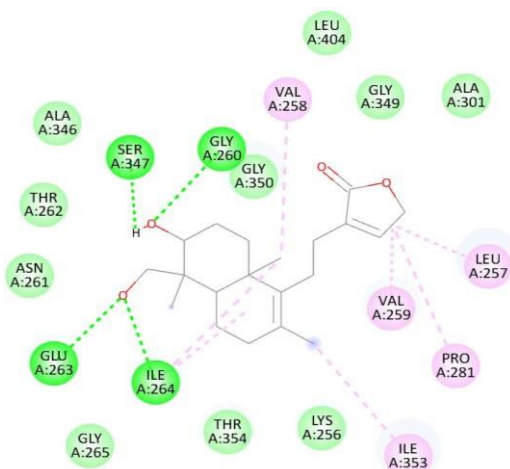
deoxy-11,12-didehydroandrographolid serta senyawa neoandrographolid yang dapat memungkinkan penggunaan sambiloto sebagai inhibitor alami enzim xanthin oksidase sudah cukup baik.



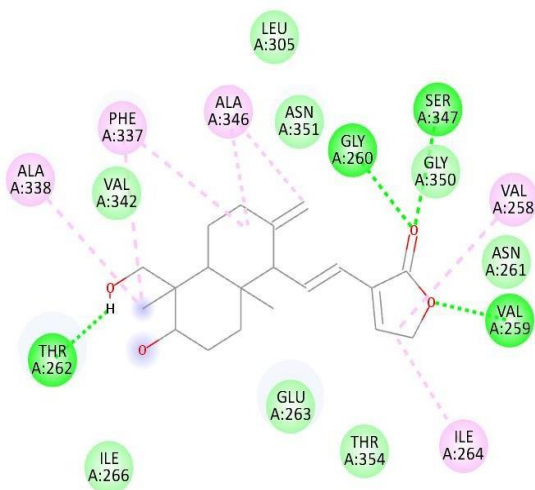
Native Ligan



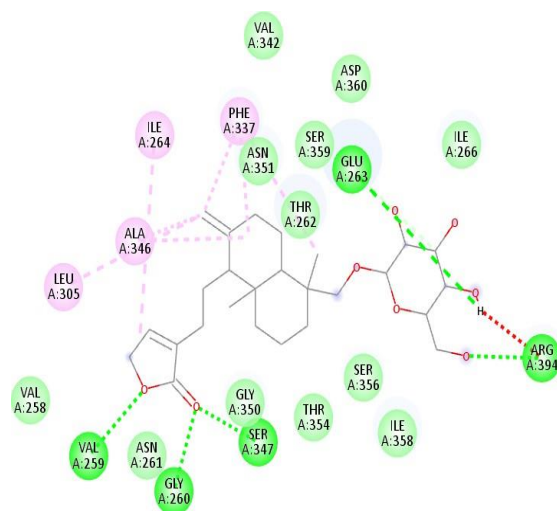
Andrographolide



Deoxyandrographolide



14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide



Neoandrographolide

Interactions

Gambar 5.2 Interaksi ikatan antara 4 senyawa uji terbaik dengan ligan

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pengujian pada senyawa aktif sambiloto. Terdapat metode yang digunakan untuk mengetahui efektivitas suatu senyawa aktif sambiloto terhadap penyakit hiperurisemia yaitu dengan visualisasi secara *in silico*. *In silico* merupakan metode yang digunakan untuk mencari kandidat senyawa dari suatu obat menggunakan metode docking molekuler. *Molecular docking* adalah suatu teknik kimia komputasi yang digunakan dalam menemukan kandidat senyawa baru sebagai pengobatan yang didasarkan pada interaksi antara reseptor, dapat berupa protein, DNA, atau RNA, dengan senyawa tertentu yang berperan sebagai ligan (Izzaturahmi *et al.*, 2023).

Tahap awal dalam metode *molecular docking* ialah preparasi makromolekul dilakukan menggunakan aplikasi Autodock Tools dengan menggunakan struktur tiga dimensi yang diperoleh dari RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) dengan kode PDB (2E1Q) yang menunjukkan visualisasi struktur kristal protein xanthin oksidase yang dirancang

dengan metode X-Ray diffraction, resolusi 2.6 Å yang memiliki empat ligan yaitu flavin adenin dinukleotida (FAD), dan kofaktor molibdopterin (MTE); molibdenum (MOM), serta salisilat (SAL) Enzim ini berperan sebagai kofaktor redoks dalam proses metabolisme purin yang memungkinkan xanthin oksidase untuk memecah senyawa purin dan menghasilkan asam urat, yang kemudian dapat di keluarkan dari tubuh (Rohmat dan Herdyastuti, 2021).

Makromolekul yang diunduh dari PDB akan dipreparasi, pada tahap ini dilakukan pemisahan terhadap molekul air, native ligan (ligan alami) dan terbebas dari residu yang bertujuan untuk menghindari terganggunya proses *docking* antara ligan dan reseptor protein. Berdasarkan hasil penelusuran terkait native ligan yang berperan aktif pada sisi aktif protein xanthin oksidase ialah FAD dibandingkan dengan MTE, MOM dan SAL. Kemudian dilakukan preparasi terhadap native ligan yaitu dengan cara memisahkan ligan tersebut dari protein dan molekul-molekul yang melekat pada strukturnya. Selanjutnya

visualisasi dan validasi menggunakan pymol untuk melihat struktur kristalografi dan hasil redocking serta untuk melihat nilai RMSDnya.

Dalam memperoleh nilai RMSD diperlukan pengaturan *grid box* yang sesuai berdasarkan letak posisi ligan dengan situs aktif reseptor pada proses *docking* dengan titik pusat x,y,z. Hasil penentuan koordinat native ligan dengan ukuran *grid box* x,y,z (29.104, 12.538, 190.589) seperti yang di tunjukkan pada tabel 5.1. Parameter reseptor dikatakan valid jika nilai RMSD <2.5 Å, karena nilai RMSD adalah acuan validitas metode penambatan *molecular* dan untuk mengetahui perubahan interaksi antara ligan dan makromolekul dengan melihat nilai penyimpangan pada saat sebelum dan sesudah di *docking*-kan (Sari *et al.*, 2020). Hasil validasi menunjukkan nilai RMSD 2.102 Å. Dengan demikian metode simulasi tersebut sudah valid dan dapat digunakan untuk penambatan terhadap ligan uji. Gambar 5.1 menunjukkan visualisasi overlay struktur ligan kristalografi dan hasil *redocked* tersebut menunjukkan kemiripan berdasarkan perubahan jarak dan konformasi ligan terbaik hasil simulasi dengan jarak dan konformasi ligan awal.

Sebelum dilakukannya proses penambatan dengan protein xanthin oksidase, terlebih dahulu dilakukan preparasi terhadap struktur senyawa aktif sambiloto yang berperan sebagai ligan uji melalui inhibisinya terhadap protein xanthin oksidase. Delapan senyawa aktif sambiloto yang digunakan dalam penelitian ini yaitu andrographolide, andrographin, aldehid, alkane, deoxyandrographolid, neoandrographolid, panikulin dan 14-

deoxy-11,12-didehydroandrographolid, Struktur senyawa aktif sambiloto tersebut dibuat menggunakan aplikasi VegaZZ berdasarkan SMILES dari kandungan senyawa sambiloto yang diperoleh dari Pubchem. Preparasi ligan uji ditambahkan atom hydrogen dan muatan gasteiger menggunakan perangkat lunak Autodock Tools. Penambahan atom hydrogen (protonasi) yaitu agar suasana saat melakukan *docking* antara ligan dan makromolekul mendekati suasana pH sitoplasma sel (pH 7) seperti pH yang ada didalam tubuh sedangkan penambahan muatan gasteiger bertujuan untuk menghitung distribusi muatan pada molekul yang mempengaruhi interaksi elektrostatis antara ligan dan reseptor (Amalia *et al.*, 2023).

Penambatan dilakukan setelah preparasi berdasarkan *docking molekuler* pada 8 senyawa aktif sambiloto sebagai ligan uji dan protein xanthin oksidase dengan 100 jumlah konformasi berdasarkan genetika algoritma (GA). Hasil yang didapatkan pada penelitian ini dari proses penambatan dari 8 senyawa uji yang telah ditambatkan dengan protein xanthin oksidase diperoleh 1 senyawa dengan nilai ΔG tertinggi dari *native ligan*-nya, dan 3 senyawa terendah dari *native ligan*-nya dimana nilai ΔG digunakan untuk menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dengan protein, karena semakin rendah nilai energi ikatan, maka ikatan yang terbentuk semakin kuat dan stabil (Rastini *et al.*, 2019). Senyawa yang memiliki nilai ΔG tertinggi dan terendah dari *native ligan* dapat di lihat pada tabel 5.2. Senyawa yang memiliki nilai afinitas tertinggi dari *native ligan*

ialah neoandrographolid. Neoandrographolid menunjukkan nilai energi ikatan lebih tinggi dibandingkan *native ligan*-nya dari hasil docking yang ditunjukkan pada tabel 5.2, Neoandrographolid mempunyai nilai afinitas (ΔG) -10.76 kKal/mol dan (Ki) 12.90 μM dibandingkan *native ligan* yang memiliki nilai afinitas (ΔG) -10.27 kKal/mol dan (Ki) 29.80, hal tersebut menunjukkan Senyawa neoandrographolid mampu berinteraksi dengan reseptor xanthin oksidase dengan membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Val259, Gly260, Glu263 dan terjadi interaksi hidrofobik melalui ikatan van der Waals Val342, Ser359, Thr262, Ile266, Val258, Gly350 dan ikatan pi-alkyl Phe337, alkyl Ala346. Semakin banyak jumlah ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang terjadi maka semakin banyak pengikatan protein ligan stabil, karena stabilitas struktur protein dipengaruhi oleh ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang terjadi sehingga senyawa neoandrographolid memiliki kemampuan dalam menghambat xanthin oksidase.

Energi ikatan terendah dari neoandrographolid dan ligan alami pada hasil penelitian ini ditunjukkan oleh 3 senyawa yaitu andrographolid, deoxyandrographolid, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid. Penambatan antara senyawa andrographolid dengan protein xanthin oksidase menunjukkan bahwa pengikatan senyawa ini sangat baik pada situs aktif protein dengan afinitas (ΔG) -9.61 kKal/mol dan (Ki) 90.48 μM . Andrographolid berinteraksi dengan protein xanthin oksidase melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik sehingga dapat

menginduksi protein xanthin oksidase pada *binding pocket* yang lebih luas. Interaksi yang terjadi melalui terbentuknya ikatan hidrogen pada residu asam amino Thr354 dan Gly260 sedangkan interaksi hidrofobik yang terbentuk pada senyawa andrographolid melalui ikatan van der Waals pada residu Val258, Gly350, Ala346, Thr262 dan ikatan Alkyl pada residu Lys256, kesamaan residu asam amino tersebut dapat dilihat pada gambar 5.2.

Senyawa 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid memiliki afinitas yang baik (ΔG) -9.55 kKal/mol dan (Ki) 100.70 μM yang berinteraksi dengan reseptor xanthin oksidase dan membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Gly260 dan Val259 serta terjadi interaksi hidrofobik melalui ikatan van der Waals pada asam amino Val342, Ile266, Gly350 dan ikatan Alkyl Ala338, Ala346, Val258 serta terjadi ikatan pi-alkyl ($\pi - Alkyl$) pada asam amino Phe337. Hal ini menunjukkan sisi aktif tempat berikatan antara *native ligan* dan senyawa 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid pada protein xanthin oksidase sudah sama, sehingga akan menghasilkan afinitas yang sama pula dengan *native ligan*nya dalam menghambat protein xanthin oksidase.

Senyawa deoxyandrographolid mempunyai afinitas yang baik (ΔG) -9.70 kKal/mol dan (Ki) 78.04 μM berinteraksi dengan reseptor xanthin oksidase dengan membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Glu263, Ile264, Gly260 dan terjadi interaksi hidrofobik melalui ikatan van der Waals Ala346, Thr262, Gly265, Lys256, Gly350, Gly349 serta ikatan Alkyl Val258, dan Ile353 seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.2, dapat dilihat dari residu asam amino senyawa

deoxyandrographolid yang sama dengan *native ligan* maka senyawa tersebut dapat berinteraksi dengan reseptor xanthin oksidase.

Penambatan berbagai ligan uji pada target aksi xanthin oksidase, menunjukkan 4 ligan yang potensial dalam menghambat enzim xanthin oksidase yaitu andrographolid, deoxyandrographolid, neoandrographolid dan 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid dibandingkan dengan ligan uji lainnya dengan jumlah ikatan residu asam amino yang lebih banyak kemiripannya pada *native ligan*. Demikian juga interaksinya dengan residu asam amino xanthin oksidase pada gambar 5.2 maka 4 senyawa tersebut mampu membentuk ikatan hidrogen pada residua asam amino Gly260 dan Val259.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian penambatan senyawa uji sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) terhadap enzim xanthin oksidase, maka dapat disimpulkan bahwa dari 8 senyawa aktif sambiloto terdapat 4 senyawa uji terbaik yang memiliki potensi dalam menghambat enzim xanthin oksidase yaitu senyawa andrographolid, deoxyandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid, dan neoandrographolid.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut atau uji lanjutan pada 4 senyawa uji yang berpotensi dalam menghambat xanthin oksidase untuk memastikan senyawa tersebut bisa dijadikan sebagai obat pada penyakit hiperuricemia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Amanda S.S. 2021. *Analisis molecular docking potensi senyawa pada daun miyana (Coleus blumei) sebagai antibiotik terhadap bakteri MRSA (Maticillin Resistant Straphylococcus aureus)*. [SKRIPSI]. Fakultas sains dan teknologi. Universitas islam negeri alauddin. Makassar.
2. Bahi RRR., Herowati R., Harmastuti N. 2020. Studi biokemoinformatika kandungan kimia daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) sebagai Antihiperglikemia serta prediksi parameter farmakokinetik dan toksisitas. *Jurnal farmasi indonesia*. Vol 17 (2) : 466-477.
3. Handayani T.L. 2017. Faktor dominan pengikatan kadar asam urat pada arhtritis di wilayah kerja puskesmas di kabupaten jember. *Jurnal riset kesehatan nasional (JRKN)*. Vol 1(2) : 95-100.
4. Hermansyah O., Salsabila J.F., Pertiwi R., Versita., Ikhsan. 2022. Studi in silico senyawa tumbuhan famili asteraceae sebagai penghambat enzim xantin oksidase. *Jurnal sains dan ilmu farmasi*. Vol 7 (2) :70-77.
5. Muthiah D., Illahi KD., Pramestutie RH., Sidharta B. 2020. Pengaruh konseling apoteker terhadap tingkat pengetahuan pasien gout dalam penggunaan allopurinol dan analgesik di apotek wilayah kota malang. *Pharmaceutical journal of indonesia*. Vol 5 (2) : 123-130.
6. Noviardi. H dan Fachrurrazie. 2015. Potensi senyawa bullatalisin sebagai inhibitor protein leukotrien A4 hidrolase pada kanker kolon secara In Silico. *Jouranl of fitofarmaka*. Vol 5 (2) : 65-73.
7. Rahmi P.E., Kumolosasi E., Jalil J., Buang F., Jamal A.J. 2022. Extracts of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness leaves exert anti-gout effects by lowering uric acid levels and reducing monosodium

- urate crystal-induced inflammation. *Journal of frontiers in pharmacology*. Vol 12 : 125-132.
8. Rohmat HLM dan Herdyastuti N. 2021. Isolasi dan pengukuran aktivitas enzim xantin oksidase. *Journal of Chemistry*. Vol 10 (1) : 96-108.
9. Sayekti S. 2021. Kadar asam urat metode enzimatik pada sampel serum dan sampel plasma EDTA (Studi di Puskesmas Tambakrejo Jombang). *Jurnal kesehatan karya husada*. Vol 9 (2) : 104-110.
10. Wulandari W., Sumarmin R. 2018. The influence of bitter extract (*Andrographis paniculata* Ness.) on uric acid level of mice (*Mus musculus* L.) male. *Jurnal Bio Sains*. Vol 1(1) : 21-30.
11. Yasin R.L., Febriyona R., Sudirman A.N.A., 2023. Pengaruh air rebusan kumis kucing terhadap penurunan asam urat di desa manawa kecamatan patilanggio. *Jurnal rumpun ilmu kesehatan*. Vol 3 (1) : 49-59.