

IDENTIFIKASI DAN MOLECULAR DOCKING KOMPONEN UTAMA MINYAK KULIT BUAH JERUK NIPIS SEBAGAI AGEN ANTIKANKER

Indah Hairunisa^{1*}, Normaidah², Sylvan Septian Ressandy¹, Fhirda Azhari¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan dan Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur

²Program Studi S-1 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat

*Email: ih787@umkt.ac.id

Artikel diterima: 3 Agustus 2019; Disetujui: 29 Oktober 2019

ABSTRAK

Kanker merupakan penyakit penyebab kematian tertinggi di dunia. Penyakit ini diketahui memiliki regulasi yang berbeda dari penyakit lainnya. Pengembangan obat dewasa ini adalah dengan menargetkan obat antikanker pada situs regulasi kanker yang ada pada *hallmark of cancer*. Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan salah satu jenis Citrus (jeruk) yang mengandung unsur-unsur senyawa kimia yang memiliki aktivitas sebagai agen antikanker. Kulit jeruk nipis diketahui memiliki kandungan bioaktif berupa minyak atsiri dan flavonoid seperti hesperidin dan hesperitin. Kandungan senyawa ini erat hubungannya dengan aktivitas antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa pada minyak kulit buah jeruk nipis dan kajian *in silico molecular docking* senyawa tersebut pada protein yang berperan dalam regulasi sel kanker. Minyak kulit buah jeruk nipis didapatkan dengan menggunakan metode distilasi uap kemudian dianalisis dengan menggunakan GC-MS untuk mengetahui komponen penyusunnya untuk selanjutnya dianalisis *in silico* menggunakan *software* YASARA 10.1.8, MarvinSketch 15.4.20, PLANTS. Hasil menunjukkan komponen utama minyak kulit buah jeruk nipis adalah senyawa d-limonen dan beta-pinen dengan persentase 59,71% dan 36,81%. Analisis *in silico* menunjukkan masing-masing senyawa ini memiliki afinitas yang lebih besar dari pada ligan native pada protein caspase-8 yang ada pada regulasi apoptosis. Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan, bahwa minyak kulit buah jeruk nipis memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker.

Kata kunci: Jeruk nipis, kanker, *in silico*, minyak

ABSTRACT

*Cancer is the highest cause of death in the world. This disease is known to have different regulations from other diseases. The development of drugs today is to target anticancer drugs on cancer regulation sites at Hallmark of Cancer. Lime (*Citrus aurantifolia*) is one type of Citrus (orange) which contains beneficial chemical compounds and active as anticancer agents. Lime peel is known to have bioactive content in the form of essential oils and flavonoids such as hesperidin and hesperitin. The content of this compound is closely related to anticancer activity.*

This study aims to identify the content of compounds in lime peel oil and the study of molecular docking silico in these compounds in protein that play a role in the regulation of cancer cells. Lime peel oil is obtained using the steam distillation method then analyzed using GC-MS to determine its constituent components to be analyzed in silico then using YASARA 10.1.8, MarvinSketch 15.4.20, and PLANTS software. The results showed that the main components of lime peel oil were d-limonen and beta-pinen with a percentage of 59.71% and 36.81%. In silico analysis shows that each of these compounds has an affinity greater than the native ligand on caspase-8 proteins (protein regulation of apoptosis). Based on these results it can be concluded, that the lime peel oil has the potential to be developed as an anticancer agent.

Keywords: *Lime, cancer, in silico, oil*

PENDAHULUAN

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan adanya abnormalitas pada regulasi pertumbuhan sel dan menyebabkan sel dapat berinvansi ke jaringan dan menyebar ke organ yang lain (Lemen *et al*, 2004). Angka kejadian kanker pada tahun 2013 di Indonesia diperkirakan sebesar 347.792 jiwa. Angka kejadian kanker tertinggi terjadi di Jawa Tengah sebesar 68.638 jiwa, sedangkan untuk Kalimantan Timur diperkirakan terdapat 6.745 pasien dengan kanker (Kemenkes RI, 2015). Kasus kanker di dunia diketahui juga masih merupakan penyebab kematian yang tinggi serta pengobatan kanker sendiri masih merupakan masalah hingga saat ini.

Pengobatan kanker yang berkembang dewasa ini dapat berupa

tindakan operasi, radiasi, terapi hormonal, antibodi monoklonal dan kemoterapi. Hingga saat ini, kemoterapi merupakan jenis pengobatan yang paling banyak diterapkan untuk pengobatan kanker. Inti dari pengobatan menggunakan kemoterapi adalah penggunaan senyawa kimia untuk membunuh sel kanker yang sedang membelah dan mencegah perkembangan selanjutnya (Radji, 2014).

Penggunaan agen kemoterapi pada mulanya akan memberikan hasil yang baik untuk pengobatan kanker. Akan tetapi, penggunaannya dalam jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya resistensi kanker (Radji, 2014). Sebagai contoh penggunaan agen kemoterapi, hormonal dan imunoterapi memberikan hasil yang positif pada 90% kasus kanker

payudara dan 50% pada kasus metastasis (Gonzalez-Angulo, 2013). Akan tetapi penggunaan secara intensif menyebabkan terjadinya resistensi kanker, sehingga diperlukan pengobatan baru untuk menaggulangi permasalahan ini.

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) termasuk salah satu jenis Citrus (jeruk) yang mengandung unsur-unsur senyawa kimia yang bermanfaat, misalnya: asam sitrat, asam amino (triptofan, lisin), minyak atsiri (sitral, limonen, felandren, lemon kamfer, kadinen, gerani-lasetat, linali-lasetat, aktilaldehid, nonilaldehid), damar, glikosida, asam sitrun, lemak, kalsium, fosfor, besi, belerang vitamin B1 dan C. Selain itu, jeruk nipis juga mengandung senyawa saponin dan flavonoid yaitu hesperidin (hesperetin 7-rutinosida), tangeretin, naringin, eriocitrin, eriocitrocid (Adina *et al*, 2008). Kulit buah jeruk nipis juga diketahui memiliki aktivitas antihiperlipid, antioksidan (Astawan dan Kasih, 2008), antibakteri (Pathan *et al*, 2012; Afroja *et al*, 2017) menghambat GTF pada *streptococcus mutans* (Adindaputri *et al*, 2013), serta mampu meningkatkan sensitifitas sel

kanker payudara MCF-7 terhadap doksorubisin (Adina *et al*, 2008).

Berbagai aktivitas biologis dari senyawa yang dikandung oleh kulit buah jeruk nipis mendorong untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap kulit buah jeruk nipis sebagai bahan alam potensial untuk dikembangkan sebagai agen antikanker. Penelitian yang akan dilakukan meliputi identifikasi senyawa metabolit sekunder dari minyak kulit buah jeruk nipis menggunakan GC-MS serta pengujian aktivitas senyawa yang dikandung oleh ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan menggunakan *molecular docking* terhadap target reseptor yang berperan dalam regulasi kanker.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Sampel buah jeruk nipis diperoleh dari Bulungan, Kalimantan Timur. Jeruk nipis yang dipilih merupakan jeruk nipis dalam kondisi matang dan dipanen tidak lebih dari 3 hari dari waktu pengiriman sampel. Sampel kemudian di determinasi dan telah di konfirmasi keabsahannya melalui dokumen uji determinasi

nomor 2/UN17.4.3.08/LL/2019. Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat distilasi uap dengan kapasitas 7-10 kg, GCMS-QP2010 SE Shimadzu, *Notebook Axioo Neon-CLW* (prosesor Intel® Core™ i3 CPU M 380 2.53GHz RAM 2.00 GB, sistem operasi Windows 7 Ultimate 32-bit), serta *software* YASARA 10.1.8 (berlisensi), MarvinSketch 15.4.20 (berlisensi), dan PLANTS (versi *trial*).

Preparasi Sampel

Sampel dipreparasi segar sesaat sebelum dilakukan distilasi. Kulit buah jeruk nipis dipisahkan dari daging buah, kemudian didistilasi. Sampel kulit buah jeruk nipis tidak melalui proses pencucian agar tetap menjaga kandungan minyak atsiri.

Destilasi Sampel

Sampel didestilasi menggunakan destilasi uap selama 6-8 jam pada suhu 90-100°C. Minyak hasil distilasi dipisahkan menggunakan corong pisah.

Analisis Minyak Atsiri dengan Menggunakan GC-MS

Minyak kulit buah jeruk nipis diuji menggunakan GC-MS untuk mengetahui komponen komponen

penyusunnya. Uji dilakukan dengan menggunakan gas pembawa Helium, suhu injektor 260°C, *split flow* 50 mL/menit, dan *running time* 60 menit.

Uji Aktivitas Antikanker dengan Menggunakan *Molecular Docking in Silico*

Pengujian *molecular docking* dilakukan dengan menggunakan protokol yang didapat dari Purnomo (2011). Secara umum, proses *molecular docking* dapat dibagi menjadi 3 tahapan yakni preparasi protein menggunakan *software* YASARA. Preparasi struktur 3D senyawa uji dibuat dengan *software* MarvinSketch. Kemudian dilakukan docking ligan dengan protein target menggunakan *software* PLANTS. Dilakukan *scoring* terhadap hasil *docking* tersebut dan visualisasi menggunakan *software* YASARA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi minyak kulit buah jeruk nipis dilakukan dengan menggunakan metode distilasi uap dengan pelarut utama akuades. Hasil distilasi menunjukkan persen rendemen sebesar 0,5%. Hasil ini menunjukkan persentase rendemen

yang lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Wahyudi *et al* (2017) mendapatkan hasil rendemen sebesar 0,83%. Perbedaan ini disebabkan oleh metode ekstraksi yang berbeda, dimana pada penelitian sebelumnya menggunakan distilasi stahl sedangkan pada penelitian ini menggunakan distilasi uap.

Minyak kulit buah jeruk nipis yang didapatkan kemudian dilakukan uji fisik. Uji ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi serta kualitas dari minyak yang didapatkan. Uji yang

dilakukan meliputi uji organoleptis, berat jenis dan indeks bias (Tabel 1). Berdasarkan hasil pengujian fisik didapatkan minyak jeruk nipis yang berwarna kuning bening konsistensi encer, dan memiliki aroma khas jeruk nipis.

Hasil yang didapatkan dari penelitian kali ini sejalan dengan hasil ekstraksi yang dilakukan oleh Wahyudi *et al* (2017) yang menyatakan hasil distilasi minyak kulit jeruk nipis memiliki warna kuning kehijauan, dengan indeks bias 1,2756 dan berat jenis 0,8549.

Tabel 1. Karakteristik minyak kulit buah jeruk nipis

| Parameter | Nilai/deskripsi |
|--------------------|-------------------------------------|
| Warna | Kuning bening |
| Aroma | Jeruk nipis dan berbau Manis permen |
| Konsistensi | Cairan encer |
| Berat Jenis (25°C) | 0,8756* |
| Indeks bias | 1,4467 |

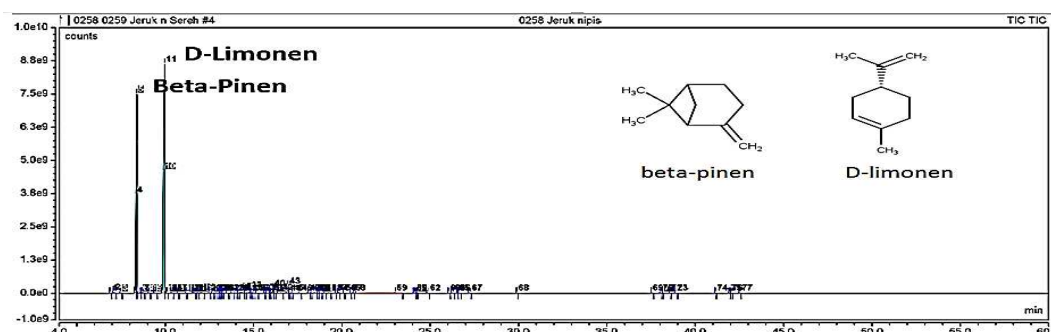
Keterangan: (*) Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan

Uji selanjutnya yang dilakukan pada minyak kulit buah jeruk nipis adalah uji kandungan utama yang terkandung di dalam minyak kulit buah jeruk nipis. Uji dilakukan dengan menggunakan GC-MS. Minyak atsiri umumnya memiliki sifat yang mudah menguap (*volatile*) dan terdiri dari campuran komponen kimia. Spektra

GC-MS yang didapatkan menunjukkan sampel minyak kulit buah jeruk nipis pada penelitian kali ini terdiri dari 77 komponen penyusun. Akan tetapi dari 77 komponen tersebut terdapat 2 kandungan utama yang menjadi komponen utama pada minyak kulit buah jeruk nipis yakni beta-pinen dan D-limonen dengan

persentase luas area sebesar 36,81% dan 59,71% (Gambar 1). Selain 2 komponen ini, komponen lainnya yang terkandung dalam minyak kulit buah jeruk nipis memiliki persentase kecil yakni kurang dari 5%. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa kandungan utama yang terdapat dalam minyak kulit buah jeruk nipis terdiri dari 4 komponen utama yakni D-limonen (31,1%), gamma-terpinen (10,8%), geranial (9,6%), dan beta-pinen (8,5%) (Simas *et al*, 2017).

Wahyudi *et al* (2017) juga melaporkan terdapat 4 komponen utama dalam minyak kulit buah jeruk nipis yakni D-limonen, beta-pinen, alfa-terpineol, dan terpinen-4-ol. Penelitian lainnya oleh Faound H.A. *et al* (2017) menyebutkan 4 komponen yang berbeda yaitu D-limonen, beta-pinen, p-mertha dan gamma-terpineol. Berdasarkan penelitian lainnya, dipastikan bahwa minyak kulit buah jeruk nipis benar mengandung D-limonen dan beta-pinen.



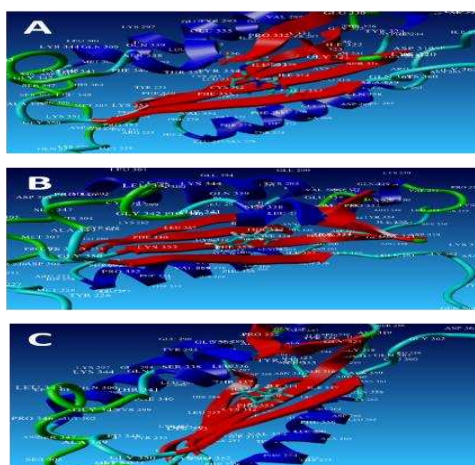
Gambar 1. Hasil kromatogram GC-MS pada sampel minyak kulit buah jeruk nipis. Hasil kromatogram menunjukkan adanya kandungan beta-pinen dan D-limonen pada minyak kulit buah jeruk nipis

Minyak kulit buah jeruk nipis yang telah diketahui mengandung komponen mayor berupa D-limonen dan beta-pinen kemudian diuji secara *in silico* menggunakan pendekatan *molecular docking* terhadap protein yang berpengaruh pada metabolisme kejadian kanker. Berdasarkan kajian

yang dilakukan untuk ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki kemampuan antikanker yang cenderung berpengaruh pada jalur apoptosis. Adina *et al* (2014) melaporkan 6-15 µg/ml ekstrak kulit buah jeruk nipis dari Indonesia dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara

MCF-7 setelah 48 jam perlakuan. Aktivitas antikanker ini kemungkinan melalui jalur apoptosis dengan induksi p53 and Bcl-2. Patil *et al* (2009) menyebutkan 100 µg/ml ekstrak jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan

sel kanker pankreas Panc-28 sebesar 73-5% dengan waktu perlakuan 96 jam melalui Induksi ekspresi Bax, Bcl-2, casapase-3, dan p53 yang semuanya merupakan protein regulator dalam proses apoptosis.



Gambar 2. Visualisasi *molecular docking* (A) Native ligan, (B) D-limonen, (C) Beta-pinen terhadap protein Caspase-8. Visualisasi 2D

Kajian *in silico molecular docking* kemudian dilakukan untuk mengetahui potensi dari 2 komponen mayor yakni beta-pinen dan D-limonen terhadap protein caspase-8. Protein caspase-8 merupakan protein inisiator dalam proses terjadinya apoptosis. Pada kejadian apoptosis caspase-8 terbentuk dari pro caspase-8 yang kemudian berperan dalam aktivasi caspase 3 dan 7 serta BID yang kemudian akan diteruskan untuk proses apoptosis. Jalur apoptosis dari caspase-8 ini dikenal dengan jalur

apoptosis ekstrinsik, dimana pada jalur ini diperlukan ligan yang berikatan dengan *death receptor* yang ada di permukaan sel kanker.

Kajian *molecular docking* merupakan konsep yang dikenal dengan ligan-resptor atau *lock and key* yang menunjukkan bahwa yang disebut dengan obat (ligan/*key*) hanya akan memberikan efek terapi/efek yang diinginkan hanya jika obat ini berikatan dengan protein (reseptor/*lock*) tertentu di dalam tubuh. Sedangkan efek obat yang baik

adalah jika obat dan protein berikatan dengan spesifikasi dan afinitas yang tinggi. *Molecular docking* dapat memprediksikan spesifikasi dan afinitas dari obat dan protein.

Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa D-limonen dan beta-pinen dapat memiliki afinitas yang cukup kuat pada caspase-8 jika dibandingkan dengan ligan native B94. Hal ini ditunjukkan dengan nilai afinitas yang lebih negatif yakni -

51,3321 untuk D-limonen dan -46,3735 untuk beta-pinen. Nilai ini lebih negatif dari ligan natif yang hanya -9.49036 (Tabel 2). Semakin negatif nilai *docking* maka semakin kuat afinitas ligan untuk berikatan dengan reseptor. Berdasarkan hasil visualisasi dengan *software* YASARA (Gambar 2), metil dari D-limonen dan beta-pinen akan berikatan dengan reseptor melalui asam amino cys-312 dan ile-314 pada caspase-8.

Tabel 2. Hasil *molecular docking* senyawa ligan D-limonen dan beta-pinen terhadap reseptor Caspase-8

| Ligan | Skor thd 3KJQ (Csp-8) | asam amino |
|------------------|-----------------------|------------------|
| Ligan native B94 | -9,49036 | ILE-314; ILE 357 |
| D-limonen | -51,3321 | CYS-312 |
| beta-pinen | -46,3735 | ILE-314 |

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang didapatkan, dapat ditarik kesimpulan sementara bahwa minyak kulit buah jeruk nipis mengandung dua komponen mayor yakni D-limonen dan beta-pinen yang berdasarkan hasil uji *in silico molecular docking* dimungkinkan berpengaruh pada proses apoptosis dengan jalan berikatan dengan Caspase-8. Adanya ikatan kuat dengan Caspase-8 ini menunjukkan bahwa minyak kulit

buah jeruk nipis memiliki potensi sebagai agen antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur atas dana penelitian dosen pemula yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

Adina AB, Handoko FF, Setyarini II, Septistyani EP, Riyanto S, Meiyanto,E.. 2008. Ekstrak etanolik kulit jeruk nipis (Citrus

- aurantifolia (cristm.) Swingle) meningkatkan sensitivitas sel mcf-7 terhadap Doxorubicin. *Proceeding Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia*.; 55-62.
- Adindaputri, Z. Purwanti, N dan Wahyudi, i.A. 2013. Pengaruh Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia* Swingle) Konsentrasi 10% Terhadap Aktivitas Enzim Glukosiltransferase *Streptococcus mutans*. *Maj Ked Gi. Desember 2013*; 20(2):126-131.
- Astawan W, Kasih AL. 2008. *Khasiat Warna-Warni Makanan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka. H. 31,101.
- Gonzalez-Angulo, A.M; Morales-Vasquez, F., dan Hortobagyi, G.N. 2007. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 608:1-22.
- Kemenkes RI. 2015. Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI, Stop Kanker. Kementrian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi. Jakarta Selatan.
- Pathan, R.K., Gali, P.R., Pathan, P., Gowtham, T. Pasupuleti, S. 2012. In vitro Antimicrobial Activity of *Citrus aurantifolia* and its Phytochemical Screening. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* S328-S331.
- Patil J, Jayaprakasha G, Chidambara Murthy K, Tichy S, Chetti M, Patil B. 2009. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. *Food Chem*;114:1351–8.
- Purnomo, Hari. 2011. *Kimia Komputasi : Molecular Docking Plants, Penambatan Molekul Plants (Protein-Ligand-Ant-System)*, Ilmu Semut. Pustaka Pelajar : Yogyakarta.
- Radji, Maksum. 2014. Mekanisme Aksi Molekular Antibiotik dan Kemoterapi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Yogyakarta
- Simas, D.L. R., Amorim, S. H. B. M., Goulart, F. R. V., Alviano, C. S., Alviano, D. S., Silva, A. J. R. 2017. Citrus Species Essential Oils and Their Components can Inhibit or Stimulat Fungal Growth in Fruit. *Industrial Crops and Products* 98, 108-115.
- Wahyudi, Tatang., Mulyawan, A.S., Kasipah, Cica., Prayudie, Untung dan Juliaha, Euis. 2017. Pembuatan Mikrokapsul Minyak Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Untuk Aplikasi Pada Penyempurnaan Tekstil. *Arena Tekstil* Vol.32, No:1.