

## Penapisan Senyawa Polifenol sebagai Inhibitor $\beta$ -Laktamase dengan Penambatan Molekuler

POPI ASRI KURNIATIN<sup>1\*</sup>, AKIMDO RULI SIMANJUNTAK<sup>1</sup>, DAN UKHRADIYA MAGHARANIQ SAFIRA PURWANTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biokimia, Fakultas MIPA, IPB University, Jl Tanjung Kampus-IPB Darmaga, Bogor 16680

\* alamat email korespondensi: popi\_asri@apps.ipb.ac.id

### Informasi Artikel

### Abstrak/Abstract

Kata Kunci: : enzim  $\beta$ -laktamase; resistensi antibiotik;  $\beta$ -laktam, polifenol, penambatan molekuler, *drug-likeness*.

$\beta$ -laktamase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis antibiotik  $\beta$ -laktam sehingga dapat menyebabkan resistensi antibiotik. Bakteri yang dilaporkan dapat menghasilkan enzim  $\beta$ -laktamase antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Burkholderia cepacia*. Saat ini resistensi terhadap antibiotik golongan  $\beta$ -laktam semakin meluas. Penggunaan antibiotik ini seringkali dikombinasikan dengan inhibitor  $\beta$ -laktamase seperti asam klavulanat, sulbaktam, dan tazobaktam untuk meningkatkan efisiensi terapi. Antibiotik betalaktam adalah antibiotik spektrum luas yang banyak menjadi pilihan untuk terapi. Oleh karena itu, pencarian kandidat inhibitor  $\beta$ -laktamase untuk mencegah resistensi perlu dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan penapisan senyawa polifenol sebagai inhibitor enzim  $\beta$ -laktamase dengan metode penambatan molekuler. Penapisan terhadap 112 senyawa polifenol dari *database* menghasilkan 27 senyawa yang memiliki energi bebas ikatan yang lebih baik dari ligan alami. Prediksi *drug-likeness* berdasarkan aturan Lipinski terhadap 27 senyawa tersebut menghasilkan 6 senyawa yang berpotensi, yaitu *trans-resveratrol 3-O-glucuronide*, *apigenin-7-O-glucoside*, *cis-resveratrol 4'-sulfate*, *sulfuretin*, dan *apigenin*. Berdasarkan visualisasi interaksi ligan-reseptor, keenam senyawa tersebut berinteraksi dengan residu katalitik enzim betalaktamase. Energi bebas ikatan terbaik ditunjukkan oleh *trans-resveratrol 3-O-glucuronide* sebesar -8,1 kkal/mol dan prediksi  $K_i$  sebesar 1,137  $\mu$ M. Berdasarkan studi penambatan molekuler dan prediksi *drug-likeness*, 6 senyawa polifenol yang berpotensi tersebut dapat dilanjutkan untuk penelitian lebih lanjut.

Keywords: :  $\beta$ -laktamase; antibiotic resistance;  $\beta$ -laktam, polyphenol, molecular docking, *drug-likeness*.

*$\beta$ -lactamase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of  $\beta$ -lactam antibiotics so that it can cause antibiotic resistance. Bacteria reported to produce  $\beta$ -lactamase include *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Burkholderia cepacia*. Currently,  $\beta$ -lactam antibiotics resistance is increasingly widespread. The use of these antibiotics is often combined with  $\beta$ -lactamase inhibitors such as clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam to increase the efficiency of therapy.  $\beta$ -lactam are broad-spectrum antibiotics that are widely used for therapy. Therefore, it is necessary to search for  $\beta$ -lactamase inhibitor candidates to prevent resistance. In this study, screening of polyphenolic compounds as inhibitors of  $\beta$ -lactamase enzyme was carried out using molecular docking methods. Screening of 112 polyphenolic compounds from the database yielded 27 compounds which had binding free energies that were better than the natural ligand. Drug-likeness prediction based on the Lipinski rules of these 27 compounds yielded 6 potential compounds, namely *trans-resveratrol 3-O-glucuronide*, *apigenin-7-O-glucoside*, *cis-resveratrol 4'-sulfate*, *sulfuretin*, and *apigenin*. Based on the visualization of the ligand-receptor interactions, the six compounds interact with the catalytic residues of the beta-lactamase enzyme. The best binding free energy was shown by *trans-resveratrol 3-O-glucuronide* of -8.1 kcal/mol and its  $K_i$  prediction of 1,137  $\mu$ M. Based on molecular docking studies and prediction of drug-likeness, the 6 potential polyphenolic compounds can be continued for further research.*

## PENDAHULUAN

Enzim  $\beta$ -laktamase adalah enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan C-N pada cincin beta-laktam dan mengakibatkan antibiotik tidak dapat berikatan dengan protein transpeptidase sehingga terjadi kehilangan kemampuan untuk menghambat pembentukan dinding sel bakteri [1]. CTX-M beta-laktamase merupakan enzim *extended-spectrum beta-lactamase* yang umum pada manusia [2]. ESBL adalah enzim yang diproduksi dalam plasmid bakteri Gram negatif dari kelompok *Enterobacteriaceae* yang sudah memiliki resistensi terhadap antibiotik beta-laktam [3]. Bakteri penghasil ESBL yang paling umum dikenal adalah *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*, kedua bakteri tersebut sering dianggap sebagai penyebab utama infeksi saluran kemih, pneumonia, dan sepsis [4].

Polifenol merupakan senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai toksin dalam protoplasma, mampu merusak dan menembus dinding sel, serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktivkan enzim penting di dalam sel bakteri meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah. Polifenol dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein, menginaktivkan enzim, dan menyebabkan kebocoran sel. Beberapa jenis polifenol yang memiliki aktifitas penghambatan beta-laktamase seperti epicatechin, asam tanat, epigallocatechin gallate, quercetin, rutin, dan eugenol adalah yang terbaik di antara semua senyawa fenolik yang diuji [5].

Beta-laktamase terbukti menurunkan efektivitas dari beta-laktam sehingga menyebabkan resistensi pada bakteri. Beberapa jenis polifenol diketahui dapat menghambat enzim beta-laktamase. Oleh karena itu, perlu dilakukan penapisan senyawa polifenol dari berbagai sumber alami yang dapat menghambat enzim beta-laktamase untuk mengatasi resistensi terhadap antibiotik beta-laktam.

Penelitian yang dilakukan bertujuan menyaring secara virtual senyawa polifenol alami di *data bank* molekul yang memiliki potensi terbaik sebagai inhibitor beta-laktamase menggunakan Teknik penambatan molekuler serta prediksi *druglikeness*.

## EKSPERIMEN

Penelitian dilakukan secara *in silico* menggunakan berbagai perangkat lunak dan pangkalan data.

### Material

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu struktur 3D reseptor 3G31 yang diunduh melalui RSCB *protein database* <https://www.rcsb.org/> dalam format \*.pdb, serta struktur 3D senyawa polifenol sebagai ligan uji yang dipilih secara acak sebanyak 112 ligan, serta epigallocatechin gallate sebagai ligan pembanding diunduh melalui *database* molekul virtual ZINC (<https://zinc.docking.org/>) dan Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format \*.sdf.

### Instrumentasi

Alat yang digunakan adalah laptop Asus Vivobook S14 dengan sistem operasi Windows 10 64-Bit, serta perangkat lunak (software) MarvinView, Discovery Studio Visualizer 2017 Client, PyRx virtual screening tools, AutoDock Vina Tools (The Scripps Research Institute, USA), dan Ligplot+ 1.5.4.

### Prosedur

#### Preparasi struktur ligan

Seluruh ligan diunduh dari pangkalan data dalam struktur dua dimensi (2D) yang kemudian ditransformasikan menjadi struktur tiga dimensi (3D) menggunakan perangkat lunak Marvinview dan disimpan dalam bentuk format PDB. Hasil preparasi tersebut kemudian dioptimasi dengan menghilangkan molekul air dan menambahkan ion hidrogen dan disimpan ke dalam format PDBQT (Modifikasi [6] dan [7]).

#### Preparasi struktur reseptor

Struktur protein beta-laktamase diunduh pada situs [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb) dengan kode 3G31. Reseptor yang digunakan dalam penambatan molekuler harus memiliki syarat resolusi kristalogi kurang atau sama besar dengan 2.5 Å dan stabil dalam bentuk struktur 3D. Protein reseptor kemudian dibersihkan dari molekul air dan ligan yang masih menempel pada strukturnya dan ditambahkan ion hidrogen menggunakan

perangkat lunak Discovery Studio Visualizer. Struktur tersebut kemudian disimpan dalam bentuk format PDB. Hasil preparasi tersebut kemudian diubah ke dalam format PDBQT menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (Modifikasi [6]).

#### Validasi metode penambatan molekuler

Struktur reseptor dan ligan alami yang telah dipreparasi dibuka pada aplikasi AutoDock Tools 1.5.6 untuk membuat *gridbox* dengan menentukan *center point* serta ukuran dimensi (x, y, dan z). Hasil pengaturan *gridbox* diatur dengan *redocking* ligan alami sebanyak 10 kali menggunakan parameter validasi metode penambatan molekuler yaitu nilai *Root Mean Deviation* (RMSD) (Modifikasi [8] dan [9]).

#### Penapisan virtual ligan

Ligan uji, ligan pembanding, dan reseptor hasil preparasi dibuka pada aplikasi PyRx-Virtual Screening Tool untuk dilakukan penapisan virtual. Program dijalankan dengan mengatur *center point*  $x=28.889$ ,  $y=91.553$ , dan  $z=-8.101$ . Hasil penapisan virtual berupa nilai afinitas pengikatan dan RMSD diunduh dengan format \*.csv (Modifikasi [10]).

#### Prediksi druglikeness dan farmakokinetik

Ligan-ligan yang lolos pada penapisan virtual kemudian dianalisis *druglikeness* berdasarkan aturan Lipinski melalui laman <http://www.scfbio-itt.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. (Modifikasi [11]).

#### Penambatan molekuler

Penambatan molekuler dilakukan menggunakan AutoDock Tools 1.5.6 dan AutoDock Vina (Scripps Research Institute, USA). Folder Vina diletakkan pada drive C. File reseptor dan seluruh ligan hasil preparasi dengan format \*.pdbqt kemudian dimasukkan ke dalam folder Vina. Dokumen *configuration* dibuat menggunakan notepad dengan memasukkan data berupa nama reseptor dan ligan yang digunakan, nama dokumen hasil penambatan molekuler (output), dan *center point* serta dimensi seperti yang diatur pada tahap validasi metode. Penambatan molekuler dilakukan menggunakan program command prompt "cmd", lalu perintah pemrograman dilakukan hingga berada difolder Vina. Perintah pemrograman

untuk menjalankan program penambatan molekuler yaitu "C:\vina --config config.txt --log log.txt". Hasil penambatan molekuler didapatkan dokumen output dengan format \*.pdbqt dan log dengan format \*.txt. Dokumen output dibuka menggunakan aplikasi Discovery Studio Visualizer. Dokumen log yang berisi data nilai perubahan energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) dan RMSD (Modifikasi [8] dan [7]).

#### Visualisasi hasil docking dan analisis konstanta inhibisi

Visualisasi hasil penambatan molekuler dilakukan dalam bentuk 2D dan 3D. Berdasarkan hasil penambatan molekuler, model penambatan ligan dengan reseptor yang memiliki afinitas pengikatan tertinggi dan visualisasi 3D yang paling mendekati daerah reseptor dipilih. Model ligan terpilih digabungkan dengan reseptor menggunakan *software* Discovery Studio 2016 Client menggunakan aplikasi Discovery Studio 2016 Client ke dalam format \*.pdb dan simpan dalam folder C:\tmp. Hasil *docking* \*.pdb dibuka menggunakan *software* Ligplot+ versi 2.2 dan dilakukan visualisasi 2D serta visualisasi 3D dilakukan menggunakan *software* PyMOL. Nilai *binding affinity* dari hasil penambatan molekuler digunakan untuk menghitung nilai konstanta inhibisi ( $K_i$ ) berdasarkan persamaan berikut:

$$\Delta G = -RT \ln K_i$$

Keterangan:

$\Delta G$  = Energi bebas ikatan  
R = Konstanta ideal gas (1,986 kal/molK)  
T = Suhu (298 K)  
 $K_i$  = Konstanta inhibisi  
(Modifikasi [12])

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menambatkan kembali (*redocking*) ligan alami ((2S)-2-[(3aR,4R,7S,7aS)-1,3-dioxooctahydro-2H-4,7-methanoisindol-2-yl]propanoic acid atau GF1) pada sisi aktif reseptor. Redocking dilakukan sebanyak dua puluh kali. Daerah penambatan (*grid box*) pada enzim beta-laktamase memiliki ukuran dimensi  $x=15$ ,  $y=15$ , dan  $z=15$  serta *center point* (pusat) yaitu  $x=28.889$ ,  $y=91.553$ , dan  $z=-8.101$ .

Hasil validasi menunjukkan konformasi yang dekat antara ligan alami hasil docking dengan hasil kristalografi (**Gambar 1**). Nilai *Root*

*Mean Square Deviation* (RMSD) yang dihasilkan sebesar 1.1290 Å. RMSD digunakan untuk mengukur perbedaan *backbones* protein untuk mengetahui kesesuaian proses penambatan dengan membandingkan perubahan konformasi ligan alami sebelum dan sesudah validasi [13]. Nilai RMSD yang dapat diterima (*valid*) pada proses validasi metode penambatan molekuler yaitu kurang dari 2 Å, karena semakin kecil nilai RMSD maka semakin dekat (mirip) posisi ligan alami hasil docking dengan ligan alami hasil kristalografi [14]. Hasil validasi tersebut menunjukkan *grid box* dan *center point* (pusat) dapat digunakan sebagai metode penambatan molekuler pada ligan uji.



Gambar 1 Pose ligan hasil validasi

### Penapisan Virtual

Penapisan virtual dilakukan terhadap 112 ligan uji polifenol yang berasal dari sumber alami dan ligan pembanding menggunakan perangkat lunak PyRx. Pemilihan ligan pada penapisan virtual dilakukan berdasarkan nilai energi bebas ikatan yang lebih tinggi dari ligan alami (GF1) yaitu -6,4 kkal/mol. *Epigallocatechin Gallate* sebagai ligan pembanding memiliki nilai energi bebas ikatan sebesar -7,8 kkal/mol. Penapisan menghasilkan 27 ligan uji yang memiliki nilai energi bebas ikatan lebih tinggi dari ligan alami (Tabel 1).

Tabel 1 Ligan uji hasil penapisan virtual

Senyawa	$\Delta G$ (kkal/mol)
<i>Epigallocatechin 3,3',-di-O-gallate</i>	-8,8
<i>Hemlock tannin</i>	-8,7
<i>Tannin-isocyanate</i>	-8,1
<i>Dihydro-tannin</i>	-8,1
<i>Epigallocatechin 3,5-digallate</i>	-8,1
<i>Tannin Sulfat</i>	-8,1
<i>Vinyl-tannin</i>	-8,0
<i>Sulfomethyl tannin</i>	-8,0
<i>Diosmin</i>	-7,8

<i>Epigallocatechin</i>		-7,8
<i>Epigallocatechin (Ligan Pembanding)</i>	<i>Gallate</i>	-7,8
<i>Sulfuretin</i>		-7,7
<i>Sulfurein</i>		-7,7
<i>Diosmetin</i>		-7,6
<i>Tannin urethane</i>		-7,6
<i>cis-Resveratrol glucuronide</i>	<i>3-O-</i>	-7,6
<i>Leptosin</i>		-7,5
<i>Whiskey tannin A</i>		-7,5
<i>trans-Resveratrol glucuronide</i>	<i>3-O-</i>	-7,3
<i>Resveratrol-3-O-sulfate</i>		-7,2
<i>Resveratrol-3-O-sulfate D4</i>		-7,2
<i>cis-Resveratrol 3-sulfate</i>		-7,1
<i>Tristin</i>		-6,9
<i>Kaempferol 7-O-glucoside</i>		-6,8
<i>cis-Resveratrol 4'-sulfate</i>		-6,8
<i>Apigenin</i>		-6,8
<i>Apigenin-7-O-Glucoside</i>		-6,8
<i>Desamin</i>		-6,7

Penapisan yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan pendekatan *Structure-Based Virtual Screening* (SBVS). SBVS lebih banyak digunakan dalam penemuan ligan baru secara struktural ketika struktur protein telah berhasil dikarakterisasi [15]

### Prediksi Druglikeness Ligan

Sebanyak 27 ligan hasil penapisan virtual dianalisis *druglikeness* berdasarkan aturan Lipinski hingga didapatkan 6 ligan yang akan divisualisasikan berdasarkan nilai energi bebas ikatan yang lebih negatif dari epigallocatechin gallate sebagai ligan pembanding dan aturan Lipinski. Epigallocatechin gallate menyimpang terhadap dua aturan lipinski, sedangkan 6 ligan uji terpilih memenuhi seluruh Aturan Lipinski (Tabel 2). Aturan Lipinski merupakan analisis tentang sifat senyawa yang aktif secara oral dan parameter yang digunakan untuk menentukan sifat fisikokimianya [16]. Aturan Lipinski meliputi massa atom relatif, nilai koefisien partisi (logP), jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen [17].

**Tabel 2** Nilai Druglikeness dari ligan terpilih

Ligan	Energi afinitas (kkal/ mol)	Aturan Lipinski				
		BM (g/mol)	$\sum$ DIH	$\sum$ AIH	LogP	$\sum$ penyimpangan
Epigallocatechin gallate	-7,6	458,375	8	11	2,332	2
trans-Resveratrol 3-O-glucuronide	-8,1	404,371	6	8	3,744	1
Apigenin-7-O-Glucoside	-7,9	432,381	6	10	0,3465	1
cis-Resveratrol 4'-sulfate	-7,8	308,311	3	5	2,4498	0
Resveratrol-3-O-sulfate D4	-7,8	308,311	3	5	2,4498	0
Sulfuretin	-7,8	270,24	3	5	2,4196	0
Apigenin	-7,8	270,24	3	5	2,5768	0

Keterangan:   = Tidak memenuhi aturan Lipinski  
 $\sum$ DIH = Jumlah Donor Ikatan Hidrogen  
 $\sum$ AIH = Jumlah Akseptor Ikatan Hidrogen

Massa atom relatif ligan terpilih berada pada rentang 270-458 g/mol. Massa atom relatif berkaitan berkaitan dengan kemampuan suatu senyawa dalam proses distribusinya untuk menembus membran biologis [18]. Nilai massa atom relatif harus kurang dari 500 Da, karena nilai massa atom relatif lebih dari 500 Da tidak dapat berdifusi melintasi membran sel [19]. Nilai massa molekul relatif yang semakin rendah menunjukkan semakin baik nilai bioavailabilitas dan kemudahan untuk melintasi membran sel [20].

Berdasarkan hasil penelitian (**Tabel 2**), seluruh ligan uji telah memenuhi parameter jumlah akseptor ikatan hidrogen, kecuali dua ligan uji, yaitu *sulfurein* dan *cis-Resveratrol 3-O-glucuronide* yang memiliki jumlah donor ikatan lebih dari 5. Berdasarkan Aturan Lipinski, jumlah donor ikatan hidrogen harus kurang dari 5, sedangkan akseptor ikatan hidrogen harus kurang dari 10 [17]. Donor dan akseptor hidrogen berperan dalam memengaruhi penyerapan suatu obat, sehingga parameter tersebut penting dalam desain obat [21]. Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen menunjukkan kapasitas ikatan hidrogen tersebut, sehingga energi yang dibutuhkan untuk melakukan proses absorpsi semakin tinggi [19].

Seluruh ligan uji terpilih (**Tabel 2**) memiliki nilai koefisien partisi (logP) kurang dari 5, kecuali *sulfurein* memiliki nilai logP negatif. Berdasarkan aturan Lipinski, logP harus memiliki nilai kurang dari 5 [17]. Koefisien partisi (logP) menyatakan koefisien kelarutan dalam lemak atau air [19].

Nilai logP berhubungan dengan hidrofobitas suatu molekul, semakin besar nilai logP maka molekul tersebut semakin hidrofobik. Saat proses transportasi, suatu obat dalam tubuh tidak boleh bersifat terlalu hidrofobik karena dapat tertahan lebih lama pada membran lipid bilayer dan terdistribusi luas di dalam tubuh sehingga selektivitas ikatan terhadap enzim target berkurang [22].

### ***Penambatan Molekuler dan Visualisasi Interaksi Ligan-Reseptor***

Berdasarkan hasil penelitian (**Tabel 3**), ligan alami (GF1) memiliki nilai energi bebas ikatan sebesar -6,4 kkal/mol dan membentuk tiga ikatan hidrogen serta empat interaksi hidrofobik. Tiga residu berikatan hidrogen pada sisi aktif reseptor dan dua residu berinteraksi hidrofobik pada sisi katalitik reseptor. Ligan pembanding memiliki nilai energi bebas ikatan lebih tinggi dari ligan alami, yaitu -7,8 kkal/mol dan membentuk tujuh ikatan hidrogen serta tiga interaksi hidrofobik. Tiga residu berikatan hidrogen pada sisi katalitik dan satu residu pada sisi aktif, serta satu residu berinteraksi hidrofobik pada sisi aktif reseptor.

**Tabel 3** Energi bebas ikat dan interaksi molekul ligan-reseptor

Ligan	Energi Bebas Ikatan (kkal/mol)	Jarak Ikatan Hidrogen (Å)	Residu Asam Amino Berikatan Hidrogen	Atom pada Ligan	Residu Asam Amino Berikatan Hidrofobik
Ligan Alami	-6,4	2.87	Asn 104	O16	Ser70, Tyr105, Ser130, Asn170
		2.91	Asn 132	O15	
		3.21	Ser237	O11	
Ligan Pembanding	-7,8	2.83	Ser70	O5	Tyr105, Ser237, Gly238
		3.04		O7	
		2.92	Ser130	O7	
		2.81	Asn132	O5	
		2.79		O7	
		3.11	Glu166	O5	
		3.25	Asn170	C16	
		3.03	Asp240	O3	
<b>Ligan Uji</b>					
trans-Resveratrol 3-O-glucuronide	-8.1	2.84	Ser70	O8	Tyr105, Thr216, Gly238, Arg276
		3.05	Asn104	O1	
		2.85	Ser130	O8	
		3.02		O8	
		2.81	Asn132	O8	
		2.80	Asn170	O6	
		3.24	Pro167	O6	
		3.12	Ser237	O5	
Apigenin-7-O-Glucoside	-7.9	2.80	Asp240	O4	Tyr105, Ser130, Asn132, Thr216, Thr235, Gly236, Ser237
		3.14	Arg276	O30	
		2.92	Ser70	O5	
cis-Resveratrol 4'-sulfate	-7.8	2.86	Asn132	O2	Tyr105, Ser130, Thr235, Gly236, Ser237, Arg276
		2.98		O5	
		2.98	Glu166	O5	
		3.14		O5	
		3.00	Asn170	O5	
Resveratrol-3-O-sulfate D4	-7,8	2.88	Ser70	O6	Tyr105, Ser237
		2.93		O5	
		2.81	Asn132	O2	
		2.97		O5	
		2.95	Glu166	O5	
		3.12		O5	
Sulfuretin	-7.8	2.99	Asn170	O5	Tyr105, Asn132, Thr216, Thr235, Ser237, Arg276
		3.15	Thr216	O4	
		3.07	Arg276	O4	
		2.95	Ser70	O19	
		3.26	Asn170	O19	
Apigenin	-7.8	3.14	Arg276	O30	Tyr105, Ser130, Asn132, Thr216, Thr235, Gly236, Ser237

Keterangan :

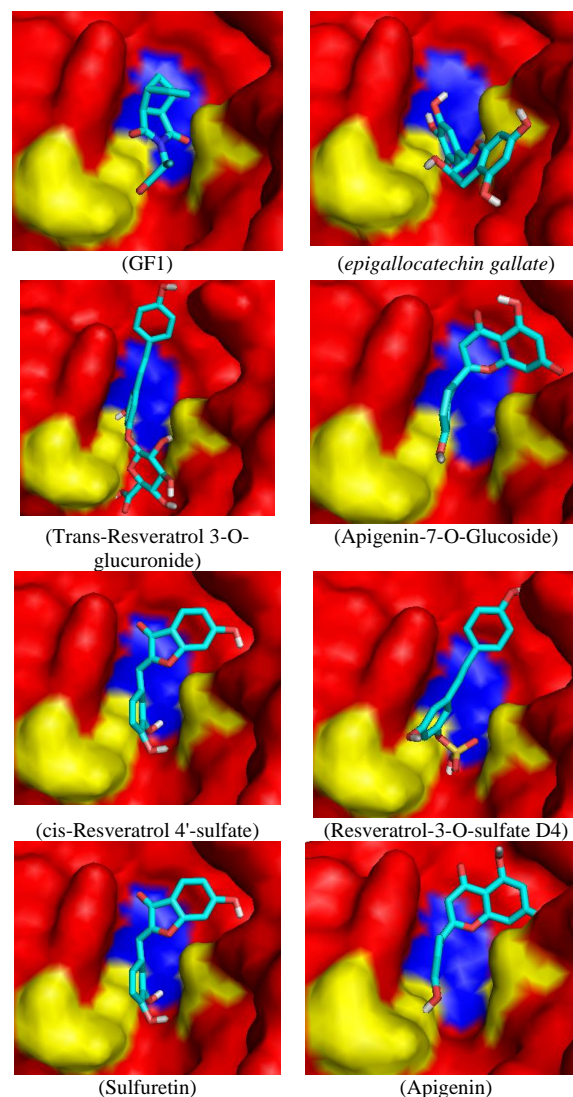
- = Residu asam amino sisi katalitik
- = Residu asam amino sisi aktif

Ligan *trans-resveratrol 3-O-glucuronide* memiliki nilai energi bebas ikatan tertinggi, yaitu -8,1 kkal/mol dan membentuk delapan ikatan hidrogen serta empat interaksi hidrofobik. Dua residu berikatan hidrogen pada sisi katalitik dan tiga residu pada sisi aktif (**Tabel 3**). *Apigenin-7-O-glucoside* memiliki nilai energi bebas ikatan lebih negatif dari ligan alami, yaitu -7,9 kkal/mol dan membentuk satu ikatan hidrogen serta tujuh interaksi hidrofobik. Satu residu berinteraksi hidrofobik pada sisi katalitik dan dua residu pada sisi aktif reseptor (**Tabel 3**).

Ligan *cis-resveratrol 4'-sulfate* memiliki nilai energi bebas ikatan lebih tinggi dari ligan alami, yaitu -7,8 kkal/mol dan membentuk empat ikatan hidrogen serta enam interaksi hidrofobik. Dua residu berikatan hidrogen pada sisi katalitik dan satu residu pada sisi aktif. Selain itu, terdapat satu residu berinteraksi hidrofobik pada sisi katalitik dan satu residu pada sisi aktif (**Tabel 3**). Resveratrol-3-O-sulfate D4 memiliki nilai energi bebas ikatan lebih tinggi dari ligan alami, yaitu -7,8 kkal/mol dan membentuk enam ikatan hidrogen serta dua interaksi hidrofobik. Dua residu berikatan hidrogen pada sisi katalitik dan satu residu pada sisi aktif, serta satu residu berinteraksi hidrofobik pada sisi aktif reseptor (**Tabel 3**).

Ligan *sulfuretin* memiliki nilai energi bebas ikatan lebih tinggi dari ligan alami, yaitu -7,8 kkal/mol dan membentuk dua ikatan hidrogen serta enam interaksi hidrofobik. Satu residu berikatan hidrogen pada sisi katalitik dan dua residu berinteraksi hidrofobik pada sisi aktif reseptor (**Tabel 3**). *Apigenin* memiliki nilai energi bebas ikatan lebih negatif dari ligan alami, yaitu -7,8 kkal/mol dan membentuk satu ikatan hidrogen serta tujuh interaksi hidrofobik. Satu residu berinteraksi hidrofobik pada sisi katalitik dan dua residu pada sisi aktif reseptor (**Tabel 3**).

Hasil visualisasi 3D menunjukkan seluruh ligan uji tertambat pada daerah penambatan (sisi katalitik dan sisi aktif reseptor) CTX-M beta-laktamase dengan pose pengikatan berbeda-beda. Bagian berwarna merah merupakan permukaan (*surface*) reseptor, bagian berwarna kuning merupakan residu asam amino sisi aktif, dan bagian berwarna biru merupakan sisi katalitik CTX-M beta-laktamase (**Gambar 2**).



**Gambar 2** Visualisasi 3D interaksi ligan-reseptor

Berdasarkan analisis interaksi dari hasil visualisasi (**Tabel 3**), ligan alami (GF1) berikatan hidrogen dengan seluruh residu sisi aktif Asn104, Asn132, dan Ser237, serta berinteraksi hidrofobik dengan residu sisi katalitik Ser70 dan Ser130 (**Gambar 2**). Ligan pembanding (*epigallocatechin gallate*) berikatan hidrogen dengan residu sisi katalitik Ser70, Ser130, Glu166, dan residu sisi aktif Asn132, serta berinteraksi hidrofobik dengan residu sisi aktif Ser237. Residu Ser130 berperan sebagai transport proton antara Lys73 dan nitrogen. Oksigen hidroksil pada residu Ser70 berfungsi sebagai nukleofil untuk menyerang karbon karbonil dari ikatan amida. Gugus NH pada rantai utama Ser70 bertindak sebagai lubang oxyanion dan membentuk interaksi ikatan hidrogen untuk menstabilkan muatan negatif. Residu Glu166 merupakan anion yang berperan dalam transport proton ke air katalitik.

Ketika Glu166 bermuatan negatif, Lys73 berinteraksi dengan Glu166 dan Ser70, namun saat Glu166 terprotonasi, Lys73 bergerak menjauh dari Glu166 dan mendekati ke Ser130 [23].

Seluruh ligan uji berikatan hidrogen maupun berinteraksi hidrofobik dengan residu Asn132 dan Ser237. Residu Asn104 dan Asn132 berperan dalam membentuk ikatan hidrogen dengan gugus asil-amida pada rantai samping serta penentuan substrat. Residu Ser237 berperan dalam interaksi dengan rantai samping oxyimino dan penting untuk aktivitas CTX-M beta-laktamase [23]. Ligan uji *trans-resveratrol 3-O-glucuronide* berikatan hidrogen dengan seluruh residu asam amino sisi katalitik dan sisi aktif, CTX-M beta-laktamase yaitu Ser70, Asn104, Ser130, Asn132, dan Ser237 (**Tabel 3, Gambar 2**). Hal tersebut menunjukkan kompleks ligan-protein yang terbentuk sangat stabil. Ligan tersebut juga memiliki kesamaan sehingga ligan tersebut dikatakan dapat menjadi kandidat potensial inhibitor CTX-M beta-laktamase.

### Prediksi Daya Inhibisi

**Tabel 4** Prediksi nilai konstanta inhibisi (Ki)

Ligan	Energi Bebas Ikatan (kkal/mol)	Konstanta inhibisi ( $\mu\text{M}$ )
Epigallocatechin Gallate (Pembanding)	-7,8	1,888
Ligan Alami	-6,4	20,116
<i>trans</i> -Resveratrol 3-O-glucuronide	-8,1	1,137
Apigenin-7-O-Glucoside	-7,9	1,595
<i>cis</i> -Resveratrol 4'-sulfate	-7,8	1,888
Resveratrol-3-O-sulfate D4	-7,8	1,888
Sulfuretin	-7,8	1,888
Apigenin	-7,8	1,888

Prediksi daya inhibisi ligan ditentukan dari nilai konstanta inhibisi (Ki) yang dihitung dari nilai energi bebas ikat [24]. Semakin kecil nilai Ki maka konsentrasi senyawa yang diperlukan untuk menghasilkan efek inhibisi terhadap reseptor juga semakin kecil [25]. Nilai Ki kurang dari 50  $\mu\text{M}$  menunjukkan hambatan kuat terhadap reseptor [26]. Berdasarkan hasil penelitian (**Tabel 4**), seluruh ligan uji memiliki nilai Ki kurang dari 50  $\mu\text{M}$ , artinya seluruh ligan berpotensi menjadi

inhibitor enzim beta-laktamase. Inhibisi terbaik ditunjukkan oleh ligan *trans-Resveratrol 3-O-glucuronide* dengan nilai Ki sebesar 1,137  $\mu\text{M}$ . *Apigenin-7-O-glucoside* memiliki nilai Ki sebesar 1,595  $\mu\text{M}$ , sedangkan *cis-resveratrol 4'-sulfate*, *resveratrol-3-O-sulfate D4*, *sulfuretin*, dan *apigenin* memiliki nilai Ki yang sama, yaitu sebesar 1,888  $\mu\text{M}$ .

*Trans-Resveratrol 3-O-glucuronide* dapat ditemukan pada tanaman anggur, kacang tanah, kubis merah, bayam, dan buah-buahan beri [27]. *Resveratrol-3-O-sulfate D4* dan *cis-Resveratrol 4'-sulfate* ditemukan pada buah yang sama dengan *Trans-Resveratrol 3-O-glucuronide* namun cara memperoleh senyawanya berbeda, yaitu dengan ekstraksi sulfat [28]. Apigenin merupakan subkelas flavon non-toksik dan non-mutagenik yang banyak ditemukan pada buah-buahan dan sayuran, seperti seledri, peterseli, artichoke (tunas bunga thistle), Cardoon (*Cynara cardunculus*). Apigenin-7-O-glucoside merupakan turunan apigenin golongan flavonoid alami yang stabil dengan kelarutan yang terbaik dari jenis flavonoid lainnya [29]. Senyawa ini dapat ditemukan pada tanaman *Elsholtzia splendens* Nakai (*Lamiaceae*) [30], bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) [29], dan mint (*Mentha longifolia* (L.)) [31]. Sulfuretin adalah flavonoid alami yang ditemukan pada tanaman mimir kamus (*Rhus verniciflua* Stokes) [32].

### SIMPULAN

Penapisan 112 senyawa polifenol dengan penambatan molekuler menghasilkan 6 senyawa potensial berdasarkan nilai energi bebas ikatan dan prediksi druglikeness, yaitu *trans-resveratrol 3-O-glucuronide*, *apigenin-7-O-glucoside*, *cis-resveratrol 4'-sulfate*, *sulfuretin*, dan *apigenin*. Keenam senyawa tersebut berinteraksi dengan residu katalitik enzim betalaktamase. Energi bebas ikatan terbaik ditunjukkan oleh *trans-resveratrol 3-O-glucuronide* sebesar -8,1 kkal/mol dan prediksi Ki sebesar 1,137  $\mu\text{M}$ .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Dr. Laksmi Ambarsari dan Rini Kurniasih, MSi atas bantuan dalam penggunaan software.

### REFERENSI



- [1] R. Y. Corvianindiya and S. Brotsotoetarno, "Resistensi bakteri oral biofilm terhadap antibiotik golongan beta-laktam," *IJD*, vol. 11, no. 2, pp. 1499-1504, 2004.
- [2] A. Widodo, M. H. Effendi and R. A. Khairullah, "Extended-spectrum beta-laktamase (ESBL) - producing *Escherichia coli* from livestock," *Sys Rev Pharm*, vol. 11, no. 7, pp. 382-392, 2008.
- [3] Y. Chong, Y. Ito and T. Kamimura, "Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-laktamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*," *Infect Genet Evol*, vol. 11, no. 7, pp. 1499-1504, 2011.
- [4] C. Ewers, A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther and L. H. Wieler, "Extended-spectrum beta-laktamase producing and AmpC producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective," *Clin Microbiol Infect*, vol. 18, no. 7, pp. 646-655, 2012.
- [5] S. M. Mandal, R. O. Dias and O. L. Franco, "Phenolic compounds in antimicrobial therapy," *J Med Food*, pp. 1-8, 2017.
- [6] M. Farhan, *Penambatan molekuler senyawa aktif okra (*Abelmoschus esculentus L.*) pada enzim alfa-glukosidase sebagai kandidat obat antidiabetes melitus*, Bogor: Institut Pertanian Bogor, 2019.
- [7] A. Putri, *Potensi inhibisi senyawa fenolik buah stroberi terhadap aktivitas enzim aldosa reduktase dengan simulasi penambatan molekuler*, Bogor: Institut Pertanian Bogor, 2019.
- [8] J. A. Jeniosa, *Penambatan molekuler senyawa kurkuminoid, xanthorizol, beta-elemenon, zedoaron terhadap aktivitas inhibisi enzim dipeptidil peptidase IV*, Bogor: Institut Pertanian Bogor, 2018.
- [9] M. B. Rastini, N. Giantri, K. Adnayani and N. Laksminai, "Molecular docking aktivitas antioksidan dari kuersetin terhadap kanker payudara secara in silico," *Jurnal Kimia*, vol. 13, no. 2, pp. 180-184, 2019.
- [10] D. Ernanda, *Penapisan virtual senyawa aktif tumbuhan manggis, meniran, dan klabet sebagai obat kanker ovarium*, Bogor: Institut Pertanian Bogor, 2019.
- [11] Frengki, D. P. Putra, F. S. Wahyuni, D. Khambri, H. Vanda and V. Sofia, "Potential antiviral of catechins and their derivatives ton inhibit SARS Cov-2 receptors of Mpro protein and spike glycoprotein in Covid-19 through the in silico approach," *Jurnal Kedokteran Hewan*, vol. 14, no. 3, pp. 59-65, 2020.
- [12] R. Pratama, L. Ambarsari and T. I. Sumaryada, "Molecular interaction analysis of COX-2 against curcuminoid and xanthorizol ligand as anti breast cancer using meclular docking," *Current Biochemistry*, vol. 2, no. 3, pp. 139-149, 2015.
- [13] I. Aier, P. K. Varadwaj and U. Raj, "Structural insight into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1-10, 2016.
- [14] F. Z. Muttaqin, M. F. Pratama and F. Kurniawan, "Molecular docking and molecular dynamic studies of stilbene derivatives compounds as srtuin-3 (sirt-3) histone deacetylase inhibitor on melanoma skin cancer and their toxicities prediction," *Journal of Pharmacopolium*, vol. 2, no. 2, pp. 112-121, 2019.
- [15] A. J. Banegas-Luna, J. Carrasco and H. P. Sanchez, "A review of ligand-based virtual screening web tools and screening algorithms in large molecular databases in the age of big data," *Future Med Chem*, vol. 10, no. 22, pp. 2641-2658, 2018.
- [16] M. S. Zubair, S. Maulana and A. Mukaddas, "Penambatan molekuler dan simulasi dinamika molekuler senyawa dari genus *Nigela* terhadap penambatan aktivitas enzim protease HIV-1," *Jurnal Farmasi Galenika*, vol. 6, no. 1, pp. 132-140, 2020.
- [17] C. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug

- discovery and development setting," *Advanced Drug Delivery Review*, vol. 23, no. 1, pp. 3-25, 1997.
- [18] T. Narko, B. Permana, R. Prasetiawati, D. Soni and F. Khairiyah, "Molecular docking study of bulb of bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L) Merr) compound as anti cervical cancer," *Farmako Bahari*, vol. 8, no. 2, pp. 1-14, 2017.
- [19] G. Syahputra, L. Ambarsari and T. Sumaryada, "Simulasi docking kurkumin enol, bisdetoksikurkumin dan analognya sebagai inhibitor enzim 12-lipoksigenase," *Jurnal Biofisika*, vol. 10, no. 1, pp. 55-67, 2014.
- [20] R. A. Rachmania, Supandi and O. A. Larasati, "Analisis in silico senyawa diterpenoid lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada reseptor alfa-glukosidase sebagai antidiabetes tipe II," *Pharmacy*, vol. 12, no. 2, pp. 210-222, 2015.
- [21] R. Hanachi, S. Belaidi, A. Kerassa and S. Boughdiri, "Structure activity/property relationships of pyrazole derivatives by MPO and QSAR methods for drug design," *Res J Pharm Biol Chem Sci*, vol. 6, no. 4, pp. 923-935, 2015.
- [22] A. Suhadi, Rizarullah and Feriyani, "Simulasi docking senyawa aktif daun binahong sebagai inhibitor enzim aldosa reduktase," *Jurnal Penelitian Kesehatan*, vol. 6, no. 2, pp. 45-65, 2019.
- [23] T. Palzkill, "Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, STX-M and KPC betalaktamase," *Front Mol Biosci*, vol. 5, no. 16, pp. 1-19, 2018.
- [24] F. J. Kelutur, R. Mustarichie and A. K. Umar, "Virtual screening kandungan senyawa kipas laut (*Gorgonia mariae*) sebagai antiasma," *Alchemy*, vol. 16, no. 2, pp. 199-210, 2020.
- [25] D. Dermawan, R. Sumirtanurdin and D. Dewantisari, "Molecular dynamics simulation of estrogen receptor alpha against andrografolid as anti breast cancer," *IJPST*, vol. 6, no. 2, pp. 65-76, 2019.
- [26] L. J. Haupt, F. Kazmi, B. W. Ogilvie, D. B. Buckley, B. D. Smith, S. Leatherman, B. Paris, O. Parkinson and A. Parkinson, "The Reliability of estimating  $K_i$  values for direct, reversible inhibition of cytochrome p450 enzymes from corresponding  $IC_{50}$  values: a retrospective analysis of 343 experiment," *Drug Metab Dispos*, vol. 43, no. 11, pp. 1-27, 2015.
- [27] R. Ruotolo, L. Calani, E. Fietta, F. Brighenti, A. Crozier, C. Meda, A. Maggi, S. Ottonello and D. Del Rio, "Anti-estrogenic activity of a human resveratrol metabolite," *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, vol. 23, no. 11, pp. 1086-92, 2013.
- [28] L. Svilar, J.-C. Martin, C. Defoort, C. Paut, F. Tourniaire and A. Brochot, "Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in human plasma using ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole-orbitrap mass spectrometry," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 1, no. 1104, pp. 119-129, 2019.
- [29] M. Smiljkovic, D. Stanisavljevic, D. Stojkovic, I. Petrovic, J. M. Vicentic, J. Popovic, S. G. Grdadolnik, D. Markovic, S. Sankovic-Babice, J. Glamoclija, M. Stevanovic and M. Sokovic, "Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions," *EXCLI J.*, vol. 23, no. 16, pp. 795-807, 2017.
- [30] H. Peng, X. Zhang and J. Xu, "Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glycoside isolation from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens*," *J Zhejiang Univ Sci B*, vol. 17, no. 6, pp. 447-54, 2016.
- [31] M. Gulluce, F. Orhan, D. Yanmis, T. Arasoglu, Z. Guvenalp and L. O. Demirezer, "Isolation of a flavonoid, apigenin 7-O-glucoside, from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subspecies *longifolia* and its genotoxic potency," *Toxicol Ind Health*, vol. 31, no. 9, pp. 831-40, 2015.
- [32] D. Lee, G. Jeong, B. Li, H. Park and Y. Kim, "Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the

- induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages," *Int Immunopharmacol*, vol. 10, no. 8, pp. 850-8, 2010.
- [33] G. Syahputra, "Peran Bioinformatika dalam desain kandidat molekul obat," *BioTrends*, vol. 1, no. 1, pp. 26-27, 2015.
- [34] X. Chen, H. Li, L. Tian, Q. Li, J. Luo and Y. Zhang, "Analysis of the physicochemical properties of acaricides based on Lipinski's rule of five," *Journal of Computational Biology*, vol. 27, no. 9, pp. 1-10, 2020.