

Pengembangan Obat Baru dari Senyawa *Curcumin*, *Genistein*, *Lactacystin*, *Phloretin*, *Quercetin* sebagai Inhibitor RNA Polimerase MTB dengan Menggunakan Metode *In Silico*

Akmal Syihabuddin^{*}, Taufik Muhammad Fakhri, Dwi Syah Fitra Ramadhan

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

^{*} akmalsyihabuddin@gmail.com, taufikmuhammadf@gmail.com, ditrakdi@gmail.com

Abstract. The discovery and development of new drugs begins with detecting the target of action of the drug which is then continued with the discovery of compounds and prediction of performance based on their chemical structure using the *in silico* method. The purpose of this study was to determine whether curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, and quercetin compounds have the potential to be developed into medicinal compounds that have activity as RNA polymerase inhibitors. The research method used was to determine the physicochemical properties of the test compounds, then predict pharmacological activity using the way2drug.com server, then prepare macromolecular structures using the BIOVIA Discovery Study Visualizer 2021 software. Then validate and simulate the docking method using MGL Tools 1.5.7 software. which is equipped with Autodock Tools 4.4. Then proceed with toxicity prediction using the PreAdmet server. The results obtained from this study are that the compound quercetin has the potential to be developed into a drug as an RNA polymerase inhibitor with a bond free energy value (ΔG) of -5.62 kcal/mol and an inhibition constant (K_i) of 76.40 M. This value is still higher than the natural ligand (rifampicin) with the value of free bond energy (ΔG) in the natural ligand of -10.33 kcal/mol and the value of the inhibition constant (K_i) of 26.63 nM. However, this value is good enough to bind to the receptor and this value has a fairly good inhibitory activity as an MTB RNA Polymerase inhibitor.

Keywords: *RNA Polymerase, In Silico, New Drug Development.*

Abstrak. Penemuan dan pengembangan obat baru dimulai dengan mendeteksi target kerja dari obat yang kemudian dilanjutkan dengan penemuan senyawa dan prediksi kinerja berdasarkan struktur kimianya menggunakan metode *in silico*. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui apakah senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin berpotensi untuk dikembangkan menjadi senyawa obat yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor RNA Polimerase. Metode penelitian yang dilakukan yaitu penentuan sifat fisikokimia senyawa uji, kemudian prediksi aktivitas farmakologi menggunakan server way2drug.com, selanjutnya dilakukan preparasi struktur makromolekul menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studi Visualizer 2021. Kemudian dilakukan validasi dan simulasi metode docking menggunakan perangkat lunak MGL Tools 1.5.7 yang dilengkapi dengan Autodock Tools 4.4. Kemudian dilanjutkan dengan prediksi toksisitas menggunakan server PreAdmet. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini yaitu senyawa quercetin memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat sebagai inhibitor RNA Polimerase dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) sebesar -5.62 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) sebesar 76.40 μ M. Nilai tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan ligan alami (rifampisin) dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) pada ligan alami sebesar -10.33 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) sebesar 26,63 nM. Tetapi nilai tersebut sudah cukup baik untuk berikatan dengan reseptor dan nilai tersebut memiliki aktivitas penghambatan yang cukup baik sebagai inhibitor RNA Polimerase MTB.

Kata Kunci: *RNA Polimerase, In Silico, Pengembangan Obat Baru.*

A. Pendahuluan

Seiring dengan perkembangan zaman penemuan dan pengembangan obat baru banyak dilakukan untuk menghasilkan produk-produk yang bermanfaat di dunia kesehatan. Penemuan dan pengembangan obat baru dimulai dengan mendeteksi target kerja dari obat yang kemudian dilanjutkan dengan penemuan senyawa dan prediksi kinerja berdasarkan struktur kimianya menggunakan metode *in silico*, dilanjutkan dengan pengujian pra klinis secara *in vivo* dan *in vitro*, serta pengujian klinis terhadap manusia yang bertujuan untuk melihat respon obat terhadap tubuh [1].

Seiring dengan perkembangan zaman, pengembangan penelitian seperti pada bidang obat-obatan dan kosmetika mulai membatasi penggunaan hewan uji dikarenakan cukup memakan waktu dan biaya yang cukup besar dalam pengujiannya serta terdapat kode etik terhadap penggunaan hewan uji, sehingga pengujian dengan menggunakan metode *in silico* menjadi salah satu pilihan pengujian pengembangan obat baru [2]. Metode *in silico* memiliki kelebihan yaitu biaya pengujiannya murah dan hasil pengujian lebih cepat [2]. Metode *in silico* merupakan metode pengembangan dengan memanfaatkan teknologi komputasi dan database untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut [2].

Senyawa bahan alam yang akan diidentifikasi yaitu curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin dengan reseptor target yaitu RNA Polimerase. Curcumin merupakan senyawa yang diduga memiliki khasiat untuk berbagai penyakit pernafasan seperti asma yang dapat terjadi pada saat mengalami infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* [3]. Genistein merupakan senyawa yang terdapat pada tanaman kedelai yang memiliki mekanisme kerja merusak ekspresi B7-1 dan pelepasan oksida nitrat dalam makrofag yang ditranfeksi MTSA [4]. Lactacystin merupakan senyawa inhibitor proteasomal ireversibel (khususnya pada subunit proteasome 20S) dan menghambat hidrolisis peptide (pada sub unit 26S kompleks). Proteasom diperlukan untuk virulensi TB karena sangat penting bagi metabolisme nitrogen bakteri [5]. Phloretin merupakan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan isolate *Mycobacterium tuberculosis* dan juga efektif untuk mengurangi peradangan pada paru [6]. Quercetin merupakan senyawa yang memiliki mekanisme kerja sebagai inhibitor sintesis glutamin dan isositrat liase yang penting dalam siklus nitrogen dan TCA [7].

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, maka terdapat rumusan masalah pada penelitian ini yaitu bagaimana interaksi antara kelima senyawa yang dipilih dengan reseptor RNA Polimerase. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui apakah senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin berpotensi untuk dikembangkan menjadi senyawa obat yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor RNA Polimerase. Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat mengetahui aktivitas senyawa dari curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin sebagai inhibitor RNA Polimerase MTB.

B. Metodologi Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan studi literature pencarian senyawa bahan alam untuk dilakukan pengembangan sebagai obat baru. Tahap awal yang dilakukan yaitu penentuan sifat fisikokimia dari senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin, selanjutnya dilakukan prediksi aktivitas farmakologi menggunakan server way2drug.com. Kemudian dilakukan preparasi struktur makromolekul RNA Polimerase yang didapat pada website (RCSB.org) dengan kode PDB 1YNN menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021. Kemudian dilakukan validasi metode docking menggunakan perangkat lunak MGL Tools 1.5.7 yang dilengkapi dengan Autodock Tools 4.4 untuk mendapat metode yang valid yang kemudian hasil validasi metode docking divisualisasi menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Visualizer 2021. Setelah metode docking dinyatakan valid, selanjutnya dilakukan simulasi molecular docking antara ke lima senyawa yang dipilih terhadap reseptor RNA Polimerase menggunakan perangkat lunak MGL Tools 1.5.7 yang dilengkapi dengan Autodock Tools 4.4 untuk melihat reaksi antara ke lima senyawa yang dipilih terhadap reseptor RNA Polimerase. Kemudian dilanjutkan dengan tahap prediksi toksisitas yang dilakukan menggunakan server PreAdmet untuk melihat memprediksi toksisitas dari senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phlorestin, dan quercetin.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan teknik *in silico* dengan menggunakan metode simulasi molecular docking dengan reseptor yang digunakan yaitu RNA Polimerase (PDB: 1YNN) dengan ligan alaminya yaitu rifampisin. Senyawa uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin.

Tahap awal dilakukan penentuan sifat fisiko kimia dari senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin serta reseptor RNA Polimerase dengan menggunakan server swissadme.ch yang terlampir pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat Fisikokimia dari senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin terhadap aturan Lipinski

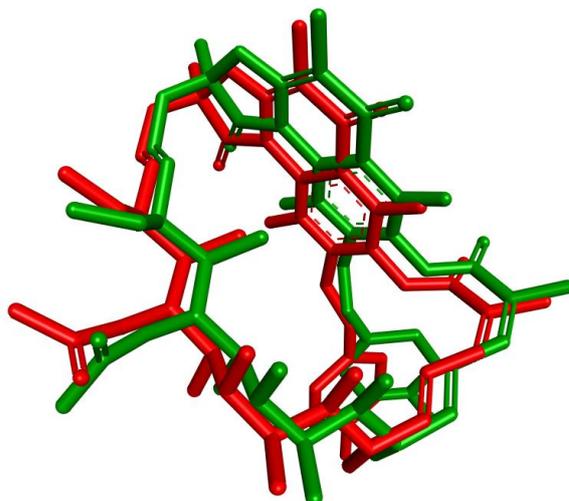
Senyawa dan Reseptor	Bobot Molekul g/mol	Molar Refraktivitas	Lipofilitas (ClogP)	Jumlah	
				Donor Ikatan Hidrogen	Akseptor Ikatan Hidrogen
Aturan Lipinski	<500	40-130	< 5	< 5	< 10
Curcumin	368.38	102.80	3.27	2	6
Genistein	270.24	73.99	1.91	3	5
Lactacystin	376.43	93.95	1.61	5	7
Phloretin	274.27	74.02	1.41	4	5
Quercetin	302.24	78.03	1.63	5	7

Berdasarkan Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa senyawa curcumin, genistein, lactacystin, phloretin, dan quercetin memenuhi aturan 5 Lipinski yang menandakan bahwa senyawa memiliki permeabilitas yang cukup yang cukup baik. Kemudian dilakukan prediksi aktivitas farmakologi dari kelima senyawa tersebut menggunakan server way2drug.com dengan menghasilkan prediksi berupa nilai Pa (Probability active) dan Pi (Probability inactive). Berdasarkan hasil analisis terhadap kelima senyawa uji memiliki aktivitas sebagai inhibitor RNA Polimerase dengan nilai Pa dan Pi yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Potensi Aktifitas Farmakologi Senyawa Uji

Nama Senyawa	Nilai		Aktifitas Farmakologi
	Pa	Pi	
Curcumin	0.339	0.107	Inhibitor RNA Polimerase
Genistein	0.241	0.234	
Lactacystin	0.392	0.032	
Phloretin	0.384	0.066	
Quercetin	0.369	0.020	

Tahap selanjutnya dilakukan preparasi struktur makromolekul RNA Polimerase yang telah diunduh pada website (RCSB.org) dengan kode PDB: 1YNN. Preparasi struktur makromolekul menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 dengan menghilangkan molekul air agar tidak mengganggu proses validasi dan simulasi molecular docking, serta memastikan agar hanya benar-benar ligand an reseptor yang bereaksi. Selain itu juga perlu ditambahkan hidrogen yang bertujuan untuk menyesuaikan suasana docking agar mendekati pH 7.



Gambar 1. Ligan alami sebelum dilakukan validasi (merah) dan ligan alami setelah validasi (hijau).

Pada Tabel 3 dapat disimpulkan bahwa reseptor RNA Polimerase memenuhi syarat karena nilai RMSD yang didapatkan yaitu sebesar 1.38, dimana nilai tersebut telah memenuhi syarat karena kurang dari 2.

Tabel 3. Hasil Validasi Metode *Docking*

Parameter	Hasil	Keterangan
Nilai RMSD	1.38	Nilai RMSD yang didapat memenuhi syarat karena < 2. Dan semakin kecil nilai
Binding Energy	-10.33	Binding Energi yang didapat maka ikatan antara ligand dengan reseptor nya akan semakin stabil serta
Konstanta Inhibisi (Ki)	26.63 nM	semakin kecil nilai konstanta inhibisinya maka senyawa tersebut memiliki aktivitas penghambatan.

Kemudian dilakukan simulasi *molecular docking* antara reseptor RNA Polimerase dengan senyawa uji *curcumin*, *genistein*, *lactacystin*, *phloretin*, dan *quercetin* menggunakan perangkat lunak *MGL Tools 1.5.7* yang dilengkapi dengan *Autodock Tools 4.4*. Tujuan dari dilakukan simulasi *molecular docking* yaitu untuk mengetahui konformasi interaksi senyawa uji yang digunakan dan afinitas pada sisi aktif reseptor RNA Polimerase dibandingkan dengan ligan alaminya yaitu rifampisin. Hasil *docking* yang diperoleh yaitu energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (Ki). Hasil dari simulasi metode *docking* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Simulasi *Molecular Docking*

Nama Senyawa	Ikatan Energi Bebas (ΔG) (kcal/mol)	Konstanta Inhibisi (Ki) (μM)
Curcumin	-5.45	101.87
Genistein	-5.56	84.41
Lactacystin	-2.36	187.70
Phlorestin	-5.26	140.35
Quercetin	-5.62	76.40

Berdasarkan hasil simulasi *molecular docking* ke lima senyawa tersebut tidak ada yang lebih baik dibandingkan dengan ligan alaminya. Senyawa yang memiliki skor *docking* paling bagus yaitu senyawa *quercetin* dengan nilai energi bebas ikatan sebesar -5.62 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (Ki) sebesar 76.40 μM . Nilai tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan ligan alaminya (rifampisin) dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) pada ligan alami sebesar -10.33 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (Ki) sebesar 26,63 nM.

Kemudian dilakukan prediksi toksisitas terhadap senyawa uji pada server *preadmet.webservice.bmdrc.org* yang disajikan pada Tabel 5 hingga Tabel 9.

Tabel 5. Prediksi Toksisitas Senyawa *Curcumin*

ID	Value
Algae-at	0.0188401
Ames_test	Non-mutagen
Carcino_Mouse	Negative
Carcino_Rat	Positive
Daphnia-at	0.0387851
hERG_inhibition	Medium_risk
Medaka_at	0.0030707
Minnnow_at	0.00751345
TA100_10RLI	Negative
TA100_NA	Negative
TA1535_10RLI	Negative
TA1535_NA	Negative

Tabel 6. Prediksi Toksisitas Senyawa *Genistein*

ID	Value
Algae-at	0.0616777
Ames_test	Mutagen
Carcino_Mouse	Negative
Carcino_Rat	Positive
Daphnia-at	0.192167
hERG_inhibition	Medium_risk
Medaka_at	0.0589857
Minnnow_at	0.0250437
TA100_10RLI	Positive
TA100_NA	Positive
TA1535_10RLI	Negative
TA1535_NA	Negative

Tabel 7. Prediksi Toksisitas Senyawa *Lactacystin*

ID	Value
Algae-at	0.0846962
Ames_test	Mutagen
Carcino_Mouse	Negative
Carcino_Rat	Negative
Daphnia-at	4.50159
hERG_inhibition	Low_risk
Medaka_at	27.7442

Minnow_at	5.31039
TA100_10RLI	Negative
TA100_NA	Negative
TA1535_10RLI	Positive
TA1535_NA	Negative

Tabel 8. Prediksi Toksisitas Senyawa *Phloretin*

ID	Value
Algae-at	0.0227249
Ames_test	Mutagen
Carcino_Mouse	Negative
Carcino_Rat	Negative
Daphnia-at	0.10274
hERG_inhibition	Medium_risk
Medaka_at	0.017245
Minnow_at	0.0114968
TA100_10RLI	Negative
TA100_NA	Positive
TA1535_10RLI	Negative
TA1535_NA	Negative

Tabel 9. Prediksi Toksisitas Senyawa *Quercetin*

ID	Value
Algae-at	0.0378136
Ames_test	Mutagen
Carcino_Mouse	Negative
Carcino_Rat	Positive
Daphnia-at	0.214345
hERG_inhibition	Medium_risk
Medaka_at	0.0778806
Minnnow_at	0.0335026
TA100_10RLI	Negative
TA100_NA	Positive
TA1535_10RLI	Negative
TA1535_NA	Negative

Berdasarkan hasil prediksi toksisitas menggunakan server preadmet.webservice.bmdrc.org dapat disimpulkan bahwa senyawa *curcumin*, *genistein*, dan *quercetin* bersifat positif karsinogenik yaitu dapat memucu pertumbuhan sel kanker. Sedangkan pada senyawa *lactacystin* dan *phlorestin* negative karsinogenik sehingga pada ke dua senyawa tersebut cukup aman untuk dikembangkan menjadi senyawa obat.

D. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa quercetin memiliki skor docking paling baik dibandingkan dengan senyawa uji lainnya, sehingga senyawa quercetin memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat sebagai inhibitor RNA Polimerase dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) sebesar -5.62 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) sebesar 76.40 μM . Nilai tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan ligan alami (rifampisin) dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) pada ligan alami sebesar -10.33 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) sebesar 26,63 nM. Tetapi nilai tersebut sudah cukup baik untuk berikatan dengan reseptor dan nilai tersebut memiliki aktivitas penghambatan yang cukup baik sebagai inhibitor RNA Polimerase MTB.

Acknowledge

Terimakasih kepada para dosen pembimbing yang membantu penelitian ini beserta para dosen pengajar, tendik, dan juga dosen wali Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung.

Daftar Pustaka

- [1] Hairunnisa. (2019). Sulitnya Menemukan Obat Baru di Indonesia. *Majalah Farmasetika* vol. 4 No. 1.
- [2] Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J* 2013;15(1):195-218
- [3] Bai, X.; Oberley–Deegan, R.E.; Ovrutsky, A.R.; Kinney, W.H.; Weaver, M.; Zhang, G.; Honda, J.R.; Chan, E.D. Curcumin enhances human macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Respirology* 2016, 21, 951–957
- [4] Khlifi, D.; Hamdi, M.; El Hayouni, A.; Cazaux, S.; Souchard, J.P.; Couderc, F.; Bouajila, J. Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (*Globulariaceae*) Leaves. *Molecules* 2011, 16, 10592–10603
- [5] Omura, S.; Crump, A. Lactacystin: First-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. *J. Antibiot.* 2019, 72, 189–201.
- [6] Tousif, S.; Singh, D.K.; Mukherjee, S.; Ahmad, S.; Arya, R.; Nanda, R.; Ranganathan, A.; Bhattacharyya, M.; Van Kaer, L.; Kar, S.K.; et al. Nanoparticle-Formulated Curcumin Prevents Posttherapeutic Disease Reactivation and Reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* following Isoniazid Therapy. *Front. Immunol.* 2017, 8, 8.
- [7] Jeon, D.; Jeong, M.-C.; Jnawali, H.N.; Kwak, C.; Ryoo, S.; Jung, I.D.; Kim, Y. Phloretin Exerts Anti-Tuberculosis Activity and Suppresses Lung Inflammation. *Molecules* 2017, 22, 183.
- [8] Apriliyani, Bella Khofila, Hidayat, Aulia Fikri. (2021). Rancangan Pengembangan Sediaan Nanospraygel in situ Mengandung Minyak Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii* (Nees & T. Nees) Blume) untuk Pengobatan Kandidiasis Oral. *Jurnal Riset Farmasi*, 1(1), 64-72.