

AKTIVITAS ANTIHIPERPIGMENTASI LIKOPEN SECARA *IN SILICO*

M. D. Widyastuti, N. K. M. Noviyanti, I K. N. S. Sanjaya dan N. M. P. Susanti*

*Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Udayana, Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia*

**Email: dekpitsusanti@unud.ac.id*

ABSTRAK

Hiperpigmentasi disebabkan oleh terakumulasinya melanin yang berlebihan pada kulit sehingga terjadi penggelapan kulit. Hiperpigmentasi ini salah satu penyebab orang kurang percaya diri, sehingga produk kosmetik dipasaran menawarkan solusi antihiperpigmentasi. Senyawa yang umum digunakan pada produk antihiperpigmentasi adalah hidrokuinon. Permasalahan penggunaan hidrokuinon terletak pada efek samping yang ditimbulkan yaitu okronosis, genotoksisitas, dan karsinogenik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi likopen sebagai antihiperpigmentasi secara *in silico* dengan mekanisme penghambatan tirosinase dibandingkan dengan hidrokuinon. Metode yang digunakan adalah *molecular docking*. Analisis data dilakukan dengan membandingkan energi ikatan yang diperoleh dari likopen dan hidroquinone yang di-*docking*-kan dengan tirosinase. Energi ikatan dari kedua senyawa tersebut dengan tirosinase secara berturut-turut adalah -5,18 dan -4,22. Nilai energi ikatan tirosinase lebih rendah dibandingkan dengan hidrokuinon. Perbandingan energi ikatan dari likopen dan hidroquinone menunjukkan bahwa likopen merupakan senyawa yang memiliki potensi sebagai inhibitor tirosinase secara *in silico* dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan hidrokuinon.

Kata kunci: Hiperpigmentasi, Hidrokuinon, Likopen, *In Silico*

ABSTRACT

Hyperpigmentation is caused by the accumulation of excessive melanin in the skin resulting in skin merging. Hyperpigmentation is one of the reasons for some people to have lack of confidence, and thus cosmetic products on the market offer solutions as antihyperpigmentation. The compound which commonly used in antihyperpigmentation products is hydroquinone. The problems with the use of hydroquinone are the side effects caused by ochronosis, genotoxicity and carcinogenicity. The aim of this study was to know the potential of lycopene as an *in silico* antihyperpigmentation by the use of tyrosinase inhibition mechanism compared to hydroquinone. The method used was molecular docking. Data analysis was done by comparing the bonding energy obtained from lycopene and hydroquinone which was docked by tyrosinase. The bonding energy of the two compounds with tyrosinase was -5.18 and -4.22. The bonding energy of tyrosinase was lower than hydroquinone. The comparison of bonding energy between lycopene and hydroquinone showed that lycopene had the potential as an *in silico* tyrosinase inhibitor with higher activity compared to hydroquinone.

Keywords: Hyperpigmentation, Hydroquinone, Lycopene, *In Silico*

PENDAHULUAN

Paparan sinar matahari berlebih utamanya paparan sinar ultraviolet sangat mudah diperoleh dari aktivitas di luar ruangan dalam kehidupan sehari-hari, utamanya di negara beriklim tropis seperti Indonesia. Paparan sinar ultraviolet berlebih dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi melanin (pigmen kulit gelap) pada bagian epidermis, dan dermis kulit (Agustine dan Yenny, 2011). Akumulasi melanin juga dapat diakibatkan oleh penuaan karena pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) secara terus-

menerus sebagai hasil dari metabolisme oksidasi seluler (Puspitasari dkk., 2017). Akumulasi melanin pada kulit ini disebut dengan hiperpigmentasi (Agustine dan Yenny, 2011). Hiperpigmentasi adalah kondisi yang mengakibatkan terjadinya masalah penampilan atau estetika (Gazali dkk., 2014), utamanya bagi perempuan, warna kulit yang gelap kerap kali menurunkan rasa percaya diri bagi perempuan.

Obat antihiperpigmentasi yang beredar dipasaran umumnya memiliki mekanisme sebagai inhibitor tirosinase. Hingga saat ini hidrokuinon dengan konsentrasi 4% dalam

sediaan adalah inhibitor tirosinase yang paling sering digunakan dalam terapi hiperpigmentasi namun memiliki efek samping okronosis, mengakibatkan genotoksisitas, dan menghasilkan metabolit benzokuinon akibat reaksinya dengan tirosinase yang karsinogenik sehingga pemakaiannya dibatasi (BPOM, 2016; Puspitasari dkk., 2017).

Likopen merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan kuat yaitu 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin E atau 12500 kali lebih baik dari glutathion (Maulida dan Aurkanean, 2010). Antioksidan merupakan senyawa yang mampu mencegah hiperpigmentasi melalui mekanisme penghambatan ROS (Briganti *et. al.*, 2003). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensilikopen sebagai antihiperpigmentasi dengan mekanisme inhibitor tirosinase secara *in silico* dengan *molecular docking* dibandingkan dengan hidroquinone.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk penentuan aktivitas tirosinase likopen secara *in silico* adalah tirosinase yang di-*download* dari <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do> dengan kode 1WX4. Struktur dari senyawa likopen dan hidroquinone di-*download* dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Peralatan

Alat yang digunakan untuk uji *in silico* adalah komputer yang memiliki spesifikasi Windows 10 64 bit. Program untuk *docking molecular* adalah *AutoDock Tools 1.5.6*, *Chimera 1.11.1* untuk preparasi protein, dan *Hyper Chem 8* untuk preparasi serta optimasi senyawa uji.

Metode Penelitian Preparasi Protein

Preparasi protein tirosinase dilakukan menggunakan software Chimera 1.11.1. Preparasi tirosinase dilakukan dengan memisahkan protein dengan senyawa native ligandnya.

Validasi Metode Docking Molecular

Native ligand dengan tirosinase yang telah dipreparasi di-*docking*-kan kembali

sebagai tahapan dalam validasi metode. Validasi dilakukan dengan menggunakan *Auto Dock Tools 1.5.6*. Parameter validasi yang digunakan adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Distance*) < 3 Å, nilai tersebut menunjukkan protokol diterima dan *docking* dapat dilakukan.

Optimasi Likopen dan Hidroquinone 3D

Struktur 3D likopen dan hidroquinone yang telah di-*download* kemudian dioptimasi menggunakan *Hyper Chem 8*. Optimasi dilakukan pada senyawa beserta dengan atom hidrogennya. Optimasi dilakukan dengan melakukan kalkulasi single point dan geometri optimasi.

Docking Likopen dan Hidroquinone pada Tirosinase

Docking dilakukan dengan menggunakan program Autodock 4.2. Senyawa yang dianalisis didocking pada tirosinase yang telah dipreparasi. Hasil dari *molecular docking* adalah konformasi senyawa dalam berikatan dengan protein target yang memiliki energi ikatan terendah.

Analisis Data Docking Likopen dan Hidroquinone pada Tirosinase

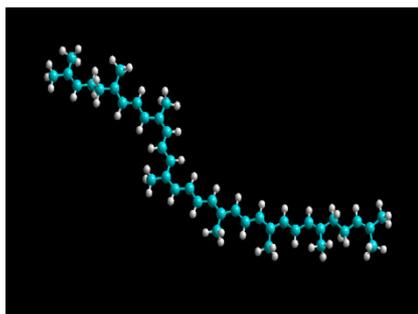
Hasil *molecular docking* adalah berupa energi ikatan. Energi ikatan yang diperoleh menggambarkan kekuatan dari ikatan antara senyawa yang di-*docking*-kan dengan reseptor. Semakin negatif energi ikatan yang diperoleh, maka makin kuat interaksi senyawa terhadap tirosinase. Hasil energi ikatan yang diperoleh dari likopen dan hidroquinone dibandingkan untuk mengetahui potensi likopen sebagai antihiperpigmentasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

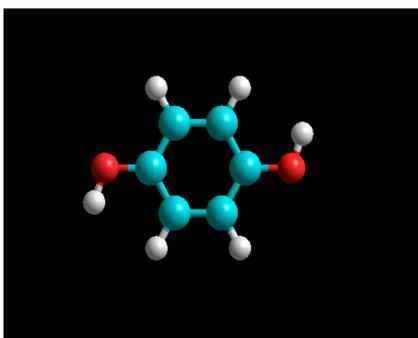
Optimasi Struktur 3D Senyawa Uji

Struktur 3D likopen dan hidroquinone dioptimasi menggunakan program Hyperchem 8 dengan metode kalkulasi semi empiris pada model AM1 (*Austin model 1*). Keunggulan dari kalkulasi semi empiris yakni memerlukan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan *ab initio*. Model AM1 merupakan model yang sangat akurat karena parameter-parameter yang diperhitungkan meliputi total energi, sifat elektronik, pembentukan panas dan geometri optimasi (Hypercube, 2002), sehingga hasil

pemodelan AM1 memiliki karakteristik senyawa hasil optimasi lebih mendekati senyawa sintetis (Tahir dkk., 2004). Pada proses optimasi, dilakukan kalkulasi single point dan optimasi geometri untuk memperoleh struktur 3D likopen dan hidrokuinon yang paling stabil dengan energi total terendah. Hasil dari optimasi struktur likopen dan hidrokuinon ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Struktur Tiga Dimensi Likopen Teroptimasi



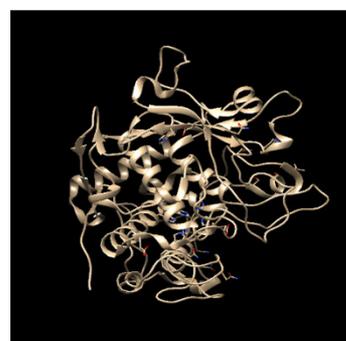
Gambar 2. Struktur Tiga Dimensi Hidrokuinon Teroptimasi

Besar energi total hasil kalkulasi *single point* likopen sebesar -11310,758379 kkal/mol dan hidrokuinon sebesar -1520,843729 kkal/mol. Setelah dilakukan optimasi geometri terjadi penurunan energi struktur, yaitu energi likopen sebesar -11359,0314 kkal/mol dan energi hidrokuinon sebesar -1522,9466 kkal/mol. Optimasi senyawa ditunjukkan dengan terjadinya penurunan energi total senyawa. Nilai energi hasil optimasi semakin rendah menunjukkan senyawa tersebut memiliki interaksi berupa gaya tarik antar atom yang semakin besar sedangkan gaya tolak antar atom menjadi semakin minimum sehingga konformasi senyawa yang diperoleh semakin stabil (Hypercube, 2002).

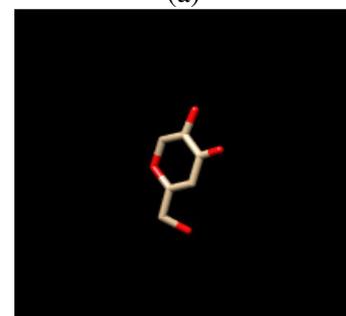
Preparasi Struktur 3D Protein Target

Tirosinase dipreparasi dengan memisahkan *native ligand* dari struktur protein menggunakan *Chimera 1.11.1*, yang mana melalui proses ini maka akan diperoleh struktur protein tirosinase tanpa *native ligand*. Tirosinase merupakan protein yang terdiri dari 4 rantai yang sama yaitu rantai A, B, C dan D (Ismaya *et.al.*, 2011), sehingga untuk proses optimasi dapat dipilih salah satu rantai tersebut, yang mana pada penelitian ini digunakan rantai A. Pemilihan rantai dilakukan untuk memfokuskan pemilihan sisi aktif dari protein target.

Optimasi dilakukan dengan pemisahan *native ligand* dengan struktur rantai protein. Pemisahan *native ligand* dari struktur rantai protein bertujuan untuk menyediakan *pocket* yang akan digunakan sebagai ruang tempat berikatan likopen dan hidrokuinon pada protein target. Selain diperoleh struktur protein tanpa *native ligand*, struktur *native ligand* yang terpisah dari protein juga diperoleh. Struktur rantai protein yang telah terpisah dari *native ligand* dan struktur *native ligand* dapat dilihat pada Gambar 3.



(a)



(b)

Gambar 3. Struktur Rantai Protein Tirosinase Tanpa *Native Ligand* (a) *Native Ligand* Tirosinase (b).

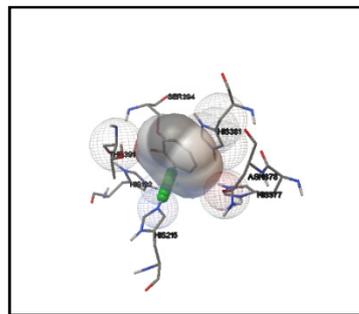
Pada proses preparasi protein, juga dilakukan eliminasi dari molekul air (H_2O) disekitar struktur protein, hal tersebut bertujuan agar molekul air tidak mengganggu proses *docking*, sehingga dapat dipastikan yang berinteraksi hanya ligan dengan protein (Tjahyono dan Hamzah, 2013). *Native ligand* dan protein yang telah dipreparasi kemudian disimpan dalam format *file .pdb*.

Validasi Metode *Molecular Docking*

Validitas metode *molecular docking* diketahui dengan cara men-*docking*-kan kembali (*redocking*) *native ligand* pada protein target menggunakan program *AutoDockTools 1.5.6*. Proses validasi metode *molecular docking* yang pertama dilakukan adalah menambahkan atom hidrogen pada protein target yang sudah memiliki *pocket cavity*. Penambahan hidrogen bertujuan untuk menyesuaikan suasana *docking* agar mendekati suasana pH di dalam tubuh (Drie, 2005). Selain itu, penambahan atom hidrogen memiliki tujuan untuk memunculkan kembali atom hidrogen pada makromolekul sehingga ikatan hidrogen yang terbentuk dapat teramati (Sastry *et al.*, 2013).

Dalam validasi metode *molecular docking*, dilakukan juga pengaturan *grid box* yang akan menjadi ruang untuk *native ligand* membentuk konformasi ketika di-*docking*-kan dengan protein target dilakukan setelah protein. *Grid box* merupakan tempat dari *ligand* untuk berinteraksi dengan residu asam amino pada *binding site* protein target. Penentuan *grid box* dilakukan untuk mengetahui titik koordinat pada *binding site* dari suatu protein. Pengaturan *grid box* yang dilakukan adalah pengaturan koordinat *grid center* dan pengaturan *grid size* (Rachmania dkk., 2016). Parameter validasi dalam *molecular docking* berupa nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD menunjukkan perbandingan konformasi *native ligand* hasil *docking* dengan konformasi *native ligand* hasil pengukuran kristalografi (Saputri dkk., 2016). Batas nilai RMSD yang dapat diterima adalah $\leq 3 \text{ \AA}$ (Jain dan Nicholls, 2008). Nilai RMSD yang diperoleh untuk protein tirosinase sebesar $0,79 \text{ \AA}$. Berdasarkan hasil tersebut, metode yang digunakan dapat dikatakan valid sehingga proses *docking* likopen dan hidrokuinon dapat dilakukan. Visualisasi interaksi antara protein tirosinase

dan *native ligand*-nya ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Visualisasi interaksi antara Tirosinase dengan *Native Ligand*-nya.

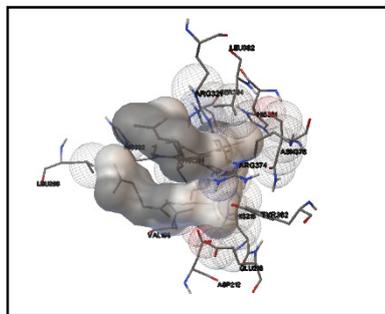
Docking Likopen dan Hidrokuinon pada Tirosinase

Senyawa likopen dan hidrokuinon yang telah dioptimasi kemudian di-*docking*-kan pada tirosinase menggunakan program *Autodock 4.2* dengan ukuran *grid box* dan koordinat yang diperoleh saat validasi metode. Penggunaan ukuran *grid box* dan koordinat yang sama pada saat validasi dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa uji di-*docking*-kan tepat pada sisi aktif dari tirosinase sesuai dengan hasil validasi. Metode yang digunakan dalam *docking* likopen dan hidrokuinon sama dengan ketika validasi metode, yaitu semirigid, yang mana senyawa diatur dalam keadaan fleksibel dan protein target dalam keadaan rigid, sehingga memungkinkan senyawa untuk mencapai konformasi optimum untuk berikatan dengan sisi aktif pada protein target.

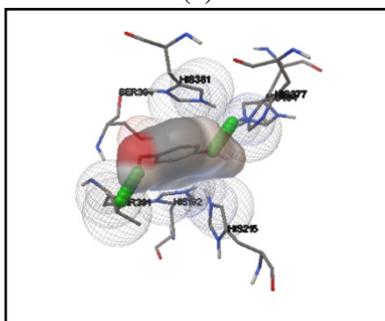
Proses *docking* menghasilkan nilai energi ikatan antara senyawa uji dengan protein target. Energi ikatan menunjukkan afinitas likopen dan hidrokuinon pada protein target. Semakin negatif energi ikatan yang diperoleh, ikatan yang terbentuk antara likopen dan hidrokuinon dengan tirosinase akan semakin stabil.

Nilai energi ikatan yang diperoleh antara likopen dan hidrokuinon dengan tirosinase berturut-turut $-5,18$ dan $-4,22$ kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa likopen dengan tirosinase memiliki ikatan yang lebih stabil dibandingkan dengan hidrokuinon dengan tirosinase. Sehingga berdasarkan hasil penelitian ini dapat diprediksi bahwa likopen memiliki aktivitas sebagai antihiperpigmentasi karena memiliki afinitas dengan tirosinase. Interaksi antara likopen dengan tirosinase

dapat menghambat pembentukan melanin, dikarenakan interaksi terjadi pada sisi aktif dari tirosinase yang mengakibatkan aktivitas inhibitor. Visualisasi interaksi antara likopen dan hidrokuinon dengan protein tirosinase ditunjukkan pada Gambar 5.



(a)



(b)

Gambar 5. Visualisasi Interaksi Likopen dengan Tirosinase (a) dan Hidrokuinon dengan Tirosinase (b).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Likopen berpotensi sebagai antihiperpigmentasi secara *in silico* dan berpotensi sebagai senyawa alternatif untuk antihiperpigmentasi.

Saran

Uji aktivitas secara *in silico* merupakan suatu uji pendahuluan yang memprediksi interaksi ligan dan reseptor. Konfirmasi aktivitas melalui uji *in vitro* dan *in vivo* perlu dilakukan untuk memastikan aktivitas.

DAFTAR PUSTAKA

Cindric, I. J., Kunstic, M., Zeiner, M., Stinger, G., and Rusak, G., 2011, Sample Preparation Methods for the Determination of the Antioxidative Capacity of

Apple Juice, *Croat. Chem. Acta*, 84 (3): 435-438

Dalimartha, S., 2008, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Jilid 5, Pustaka Bunda, Jakarta

Drie, J.H.v., 2005, *Pharmacophore-Based Virtual Screening : A Practical Perspective*, Alvarez, J. and Schoicet, B., *Virtual Screening in Drug Discovery*, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 157-205.

Gunawan, S.G., Setiabudy, R., Nafrialdi, dan Elysbeth, 2007, *Farmakologi dan Terapi*, 5th ed., Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta

Guyton, A. C., dan Hall, J. E., 1997, *Buku Ajar: Farmakologi Kedokteran*, 9th ed., a.b. Setiawan, I., Tengadi K.A., dan Santoso, A., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.

Hypercube, 2002, *Hyper Chem Release 7: Tools for Molecular Modeling*, Hypercube Incorporation, Ontario.

Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J., Wejin, A., Mes, J.J., Fusetti, F., Wichers, H.J. and Dijkstra, B.W. 2011. Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of The Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry*. 50:5477-5486.

Jain, A.N. and Nicholls, A., 2008, Recommendations for Evaluations of Computational Methods, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 22:133-139.

Rachmania, R.A., Supandi, dan Cristina, F.A.D., 2016, Analisis Penambatan Molekul Senyawa Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Reseptor α -Glukosidase sebagai Antidiabetes, *Pharmacy*, 13(2):239-251.

Saputri, K.E., Fakhmi, N., Kusumaningtyas, E., Priyatama, D. dan Santoso, B., 2016, Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase

- Dengan Autodock-Vina, *Chimica et Natura Acta*, 4(1):16-20.
- Sastry, G.M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. and Sherman, W., 2013, Protein and Ligand Preparation : Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 27(3):221–234.
- Tahir, I., K. Wijaya, Falah, I.I., dan Damayanti, R., 2004, 'Pemodelan Molekul Senyawa *Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs-Like)* sebagai Senyawa Penyerap Sinar UV', dipresentasikan pada Seminar Nasional Hasil Penelitian MIPA di Semarang, 4 Desember.
- Tjahjono, D.H., dan Hamzah, N., 2013, Studi Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas, Fitur Farmakofor, dan *Docking* Molekuler Senyawa Turunan Pirazolo-[3,4-d]-Pirimidin sebagai Inhibitor Mer Tirosin Kinase, *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 38(1):1-10.
- Tjandra, O., Rusliati, R., dan Zulhipri, 2011, Uji Aktifitas Antioksidan dan Profil Fitokimia Kulit Rambutan Rapih (*Nephelium lappaceum*), *Karya Ilmiah*, UPT Penerbitan dan Percetakan UNS, Solo
- Zainol, Q., Hidayat, E. M., dan Peryoga S. U., 2014, Antipyretic Effect of *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume Infusion in Fever-induced Rat Models, *Althea Medical Journal*, 1 (2): 81-85.