

Studi Potensi Senyawa Hesperidin dan Naringin Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai Agen *Antiphotaging* secara *In Silico*

Ni Made Rita Wiantini¹, Ni Putu Linda Laksmiani^{2*}

¹Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, ritawian@gmail.com

²Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, laksmi@unud.ac.id

*Penulis Korespondensi

Abstrak— Indonesia merupakan negara tropis dengan paparan sinar matahari sepanjang tahun yang menyebabkan penduduk Indonesia rentan mengalami *photaging*. *Photoaging* merupakan kondisi penuaan kulit yang disebabkan karena paparan sinar ultraviolet (UV) berlebihan sehingga menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* yang menginduksi aktivitas enzim *Matrix metalloproteinases-1* (MMP-1) mendegradasi kolagen berlebihan pada kulit sehingga muncul tanda *photoaging*. Maka dari itu, diperlukan agen anti-*photoaging* untuk menghambat aktivitas MMP-1. Masyarakat biasanya menggunakan kosmetik dengan klaim *antiaging* seperti serum retinol untuk menangani *photoaging*. Kulit jeruk nipis merupakan bahan alami yang dapat dimanfaatkan sebagai anti-*photoaging* karena kandungan flavonoid seperti hesperidin dan naringin memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui afinitas serta model interaksi yang terbentuk antara hesperidin dan naringin terhadap enzim MMP-1 dibandingkan dengan kontrol positif retinol sebagai agen anti-*photoaging* secara *in silico*. Penelitian dilakukan secara eksploratif melalui uji *in silico molecular docking* dengan tahapan yakni preparasi serta optimasi senyawa uji serta kontrol positif, preparasi protein target, validasi metode dan *docking* dilakukan menggunakan *AutoDockTools 1.5.6*. Berdasarkan hasil *docking* hesperidin dan naringin memiliki nilai energi ikatan masing-masing -11,73 dan -10,96 kkal/mol yang menunjukkan senyawa uji memiliki energi ikatan yang lebih negatif dari *native ligand* dan kontrol positif retinol yang memiliki energi ikatan masing-masing -10,07 dan -9,78 kkal/mol. Mekanisme molekuler senyawa uji dalam menghambat enzim MMP-1 melalui pembentukan ikatan hidrogen pada enzim tersebut. Hal tersebut menunjukkan hesperidin dan naringin memiliki afinitas yang lebih kuat dan stabil terhadap protein target dibandingkan dengan *native ligand*nya dan retinol sehingga berpotensi sebagai *antiphotaging* dan dikembangkan sebagai produk kosmetik.

Kata kunci: Anti-*photoaging*, hesperidin, MMP-1, *molecular docking*, naringin.

1. PENDAHULUAN

Dewasa ini, masalah penuaan kulit menjadi hal yang ditakuti oleh masyarakat terutama kaum wanita karena adanya paradigma bahwa seseorang dikatakan cantik apabila memiliki kulit yang kencang, halus, dan sehat sehingga hal tersebut mempengaruhi rasa percaya diri terhadap penampilan [1]. Penuaan kulit ditandai dengan penurunan kepadatan kolagen dan ketebalan dermal yang menyebabkan dermis kehilangan integritas dan kelenturannya sehingga menyebabkan kulit menjadi kendur dan berkerut [2]. Indonesia merupakan negara tropis dengan paparan sinar matahari sepanjang tahun yang membuat penduduk Indonesia rentan mengalami penuaan kulit ekstrinsik. Radiasi UV yang terdiri dari UVA dengan panjang gelombang 320–400 nm dan UVB dengan panjang gelombang 280–320 nm adalah kontributor utama penyebab *photoaging*. UVA

dapat menembus ke dalam lapisan dermis bawah kulit sedangkan UVB dapat menembus epidermis dan dermis bagian atas yang menyebabkan luka bakar akibat sinar matahari (*sunburn*) dan onkogenesis, sedangkan UVA lebih berperan dalam *photoaging* [3].

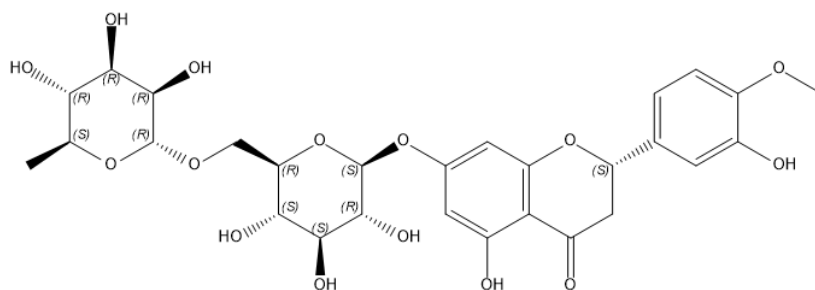
Paparan sinar UVB dan UVA yang berkepanjangan pada rentang waktu yang lama menyebabkan tingginya pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler yang berkontribusi besar pada terjadinya penuaan kulit dini yang disebut dengan *photoaging*. *Photoaging* ditandai dengan kerutan pada kulit, kulit kendur, dan permukaan kulit kasar [4]. *Photoaging* dapat menyebabkan 90% dari masalah kulit terkait usia pada pria dan wanita. Angka kejadian *photoaging* semakin meningkat selama beberapa tahun terakhir, yang mana sebuah penelitian di Australia menyebutkan 72% laki-laki dan 42% perempuan 30 tahun ke bawah mengalami kondisi *photoaging*. Sebuah survei di *Northwest England* menyimpulkan bahwa paparan sinar matahari yang diterima selama aktivitas normal sehari-hari dapat berdampak keganasan kulit yang akhirnya menjadi kanker kulit [5].

Produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan mengaktifasi jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sehingga mengakibatkan overekspresi faktor transkripsi *activator protein-1* (AP-1) yang kemudian mengaktifkan enzim *Matrix metalloproteinases* terutama MMP-1 yang berperan mendegradasi kolagen tipe I pada kulit [3]. Sitokin pro inflamasi juga meningkatkan regulasi MMP dan menurunkan serat elastin kolagen dermal. Peningkatan MMP-1 kemudian menyebabkan degradasi matriks ekstraseluler dan penurunan produksi kolagen serta biosintesis prokolagen [6]. Oleh karena itu, pengembangan inhibitor MMP dianggap sebagai strategi yang menjanjikan untuk terapi anti-*photoaging*. Masyarakat biasanya menggunakan kosmetik dengan klaim *antiaging* dalam bentuk sediaan krim, serum maupun *sunscreen* dalam menangani *photoaging*. Serum banyak digunakan dalam dunia kecantikan untuk membantu mencegah terjadinya penuaan kulit.

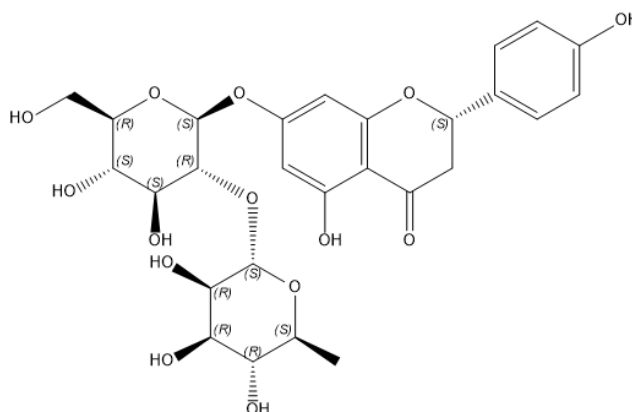
Salah satu senyawa yang telah digunakan luas dalam kosmetik untuk mencegah *photoaging* adalah retinol. Retinol merupakan turunan vitamin A yang paling efektif memperlambat proses penuaan. Retinol mencapai keratinosit, maka berikatan dengan reseptor CRBP (*Cellular Retinol Binding Protein*) sehingga merangsang aktivitas seluler keratinosit, fibroblas, melanosit, dan sel Langerhans. Selain itu, retinol yang berikatan dengan reseptor di dalam keratinosit, merangsang fibroblas untuk mensintesis serat kolagen, memperkuat fungsi pelindung epidermis, melindungi kolagen terhadap degradasi dan menghambat aktivitas *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan meningkatkan sintesis *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) yang bertanggung jawab untuk degradasi matriks ekstraseluler [7]. Penggunaan retinol topikal dapat menimbulkan efek samping yaitu eritema, rasa terbakar, kulit terkelupas, dan kulit kering serta ketidakstabilannya yang membatasi aplikasinya dalam produk kosmetik dan farmasi [8]. Maka dari itu, diperlukan pengembangan senyawa *antiphotaging* dari bahan alam dengan efek samping minimal sehingga aman digunakan dalam jangka panjang. Alternatif senyawa yang dapat dikembangkan sebagai agen *antiphotaging* adalah hesperidin dan naringin yang diisolasi dari kulit jeruk nipis.

Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai agen *antiphotaging* yakni jeruk nipis. Jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) banyak ditemukan di Asia Tenggara seperti Indonesia. Jeruk nipis

merupakan tanaman obat keluarga yang biasa digunakan oleh masyarakat untuk bumbu masakan, obat-obatan, dan minuman segar. Selama ini, ketika mengonsumsi jeruk nipis segar, masyarakat hanya menggunakan daging jeruk nipis saja, sedangkan kulitnya dianggap sebagai limbah. Oleh karena itu, penting untuk mengolah limbah di lingkungan sekitar, selain untuk mengurangi pencemaran lingkungan, produk kosmetik yang dibuat akan bernilai jual tinggi dan ramah lingkungan. Hesperidin dan naringin yang merupakan senyawa flavonoid terbanyak dalam kulit jeruk nipis memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi, antioksidan dan antikanker yang cukup kuat. Hesperidin (gambar 1) merupakan senyawa identitas dari kulit jeruk nipis yang merupakan flavonoid yang banyak terdapat dalam kulit jeruk nipis [9]. Senyawa flavonoid lain, seperti naringin (gambar 2) juga banyak diperoleh di dalam kulit jeruk nipis menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Penelitian Singanusong *et al.*, (2014) melaporkan kandungan kulit buah *Citrus aurantifolia* mengandung hesperidin sebanyak 25,7 mg/100g dan naringin sebanyak 26 mg/100g [10]. Ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis telah diteliti memiliki daya antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} 54,458 ppm [11]. Penelitian lain yang dilakukan oleh Hindun dkk., (2017) juga menyatakan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis memiliki potensi sebagai inhibisi enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} 42,11 mg/mL [12].



Gambar 1. Struktur Hesperidin
Sumber: Pubchem (2022)



Gambar 2. Struktur Naringin
Sumber: Pubchem (2022)

Penelitian oleh Lee *et al.*, (2018), melaporkan uji *in vivo* hesperidin yang dilakukan terhadap tikus tidak berbulu yang diinduksi UVB dapat mencegah timbulnya *photoaging*. Perlakuan dengan

hesperidin pada tikus yang disinari UVB menurunkan produksi sitokin inflamasi dan aktivitas enzim MMP-9 di kulit. Hal ini menunjukkan bahwa hesperidin memberikan efek fotoprotektif dengan mengurangi respon inflamasi terhadap radiasi UVB [13]. Penelitian oleh Das *et al.*, (2018), melaporkan bahwa sel kulit tikus NIH-3T3 yang diberi radiasi sinar UVB 20 mJ/cm² dan terapi naringin dosis 60 µM mampu mencegah sitotoksitas sel, pembentukan ROS, kerusakan DNA, mencegah aktivasi protein MAP kinase yang diinduksi UVB dan aktivasi faktor inflamasi yang dimediasi oleh faktor-κB (NF-κB)-nuklear, yaitu TNF-α, IL-6, IL-10, dan COX-2 di sel NIH-3T3 [14].

Berdasarkan studi pustaka yang telah dilakukan, potensi senyawa hesperidin dan naringin sebagai agen *antiphotoaging* melalui mekanisme penghambatan enzim MMP-1 belum dilaporkan. Oleh karena itu, diperlukan penelusuran potensinya terkait afinitasnya terhadap enzim MMP-1. Pengembangan suatu senyawa obat membutuhkan biaya yang sangat mahal dan tahapan panjang dengan kemungkinan risiko ketidaksesuaian hasil cukup tinggi. Oleh karena itu, diperlukan suatu uji pendahuluan berdasarkan afinitas dan mekanisme molekuler dari hesperidin dan naringin guna menilai potensinya sebagai *antiphotoaging*, sehingga hasil yang diperoleh lebih tepat dan memperkecil terjadinya *trial and error*. Potensi tersebut dapat diuji menggunakan metode *molecular docking*. *Molecular docking* adalah metode *in silico* berbasis struktur yang paling populer untuk membantu memprediksi interaksi antara molekul dan target biologis [15]. Hasil interaksi *molecular docking* antara ligan dengan protein menghasilkan nilai afinitas dan jenis ikatan. Metode ini akan meningkatkan efektivitas dan efisiensi penelitian penemuan obat dengan keuntungan lebih murah, tidak menggunakan bahan kimia, dan waktu yang dibutuhkan lebih singkat [16]. Melalui teknik *molecular docking* secara *in silico* diharapkan dapat diperoleh konfirmasi afinitas senyawa hesperidin dan naringin untuk menghambat ekspresi enzim MMP-1.

2. METODE

Penelitian dilakukan dengan rancangan eksploratif secara *in silico* terhadap protein target yaitu enzim MMPs yaitu MMP-1.

2.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Seluruh tahapan penelitian ini dilakukan secara komputasi menggunakan perangkat komputer. Keseluruhan tahapan penelitian termasuk penelusuran pustaka hingga proses penyusunan artikel dilakukan selama dua bulan.

2.2. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dalam penelitian meliputi komputer dengan spesifikasi Windows 10 64 bit. Program *Open Babel Gui* dan *HyperChem8* untuk preparasi dan optimasi senyawa uji, program *Chimera 1.11* untuk preparasi protein target, program *AutoDockTools 1.5.6* yang dilengkapi program *Autodock4* dan *Autogrid4* untuk proses validasi dan *docking* senyawa uji. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah struktur tiga dimensi senyawa uji hesperidin dan naringin serta kontrol positif retinol yang diunduh dari situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Struktur enzim MMP-1 (PDB ID: 966C) yang diunduh dari <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1 Optimasi Hesperidin dan Naringin 3D serta Kontrol Positif Retinol

Struktur tiga dimensi hesperidin, naringin dan retinol diunduh menggunakan format .sdf dari situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Struktur senyawa uji dan kontrol diubah dari format .sdf menjadi format .pdb dengan program Open Babel Gui. Selanjutnya, optimasi hesperidin, naringin dan retinol dilakukan menggunakan program *HyperChem 8* dilengkapi dengan atom hidrogennya menggunakan metode komputasi semi empiris *Model Austin* (AM1) dengan titik tunggal perhitungan dan optimasi geometri.

2.3.2 Preparasi Enzim MMP-1

Struktur enzim target MMP-1 diunduh dari <https://www.rcsb.org/>. MMP-1 (PDB ID: 966C) dibuat dengan memisahkan enzim dari ligan aslinya menggunakan Chimera 1.10.1 yang mana memiliki enzim MMP-1 memiliki *native ligand* yaitu *N-hydroxy-2-[4-(4-phenoxy-benzenesulfonyl)-tetrahydro-pyran-4-yl]-acetamide* (PDB ID: RS2) digunakan untuk studi *docking molecular*.

2.3.3 Validasi Metode *Docking Molecular*

Validasi *molekuler docking* dilakukan dengan aplikasi Autodock Tools 1.5.6 yang dilengkapi Autodock4 dan Autogrid4 dengan melakukan *redocking native ligand* RS2 pada enzim MMP-1 yang telah disiapkan. Koordinat kotak grid yang terdiri dari dimensi x, y dan z telah ditetapkan meliputi pusat grid pada x=9,166, y= -10,353, z= 38,398 dan ukuran grid pada x = 40, y = 40, z = 40. Parameter validasi *molekuler docking* didasarkan pada nilai *root mean square deviasi* (RMSD) dengan $\leq 2.0 \text{ \AA}$. Semakin rendah nilai RMSD dalam proses *redocking* menunjukkan bahwa *pose* ligand yang diprediksi semakin mendekati konformasi *native ligand* [17].

2.3.4 *Docking* hesperidin, naringin dan retinol dengan enzim MMP-1

Senyawa uji hesperidin, naringin dan retinol hasil optimasi kemudian *didockingkan* pada enzim MMP-1 yang telah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program Autodock 4.2. Hasil analisis data akan menunjukkan senyawa yang memiliki konformasi energi ikatan terendah untuk berikatan dengan enzim target.

2.3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode deskriptif. Hasil *molekuler docking* berupa energi ikatan dan jenis ikatan antara senyawa dengan protein target. Nilai energi ikatan menunjukkan afinitas antara senyawa dan protein target. Semakin negatif harga energi ikatan, maka ikatan antara hesperidin dan naringin terhadap protein target MMP-1 semakin kuat dan stabil. Energi ikatan antara senyawa uji dibandingkan dengan energi ikatan *native ligand* dan retinol sebagai pembanding. Jika energi ikatan antara hesperidin dan naringin dengan enzim MMP-1 lebih negatif, maka semakin kuat interaksi yang terjadi antara senyawa uji dan enzim sehingga berpotensi sebagai agen *antiphotoaging*. Jenis ikatan yang terbentuk dan residu yang berikatan antara senyawa terhadap protein target MMP-1 juga diamati seperti ikatan hidrogen, ikatan, hidrofobik dan elektrostatik.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

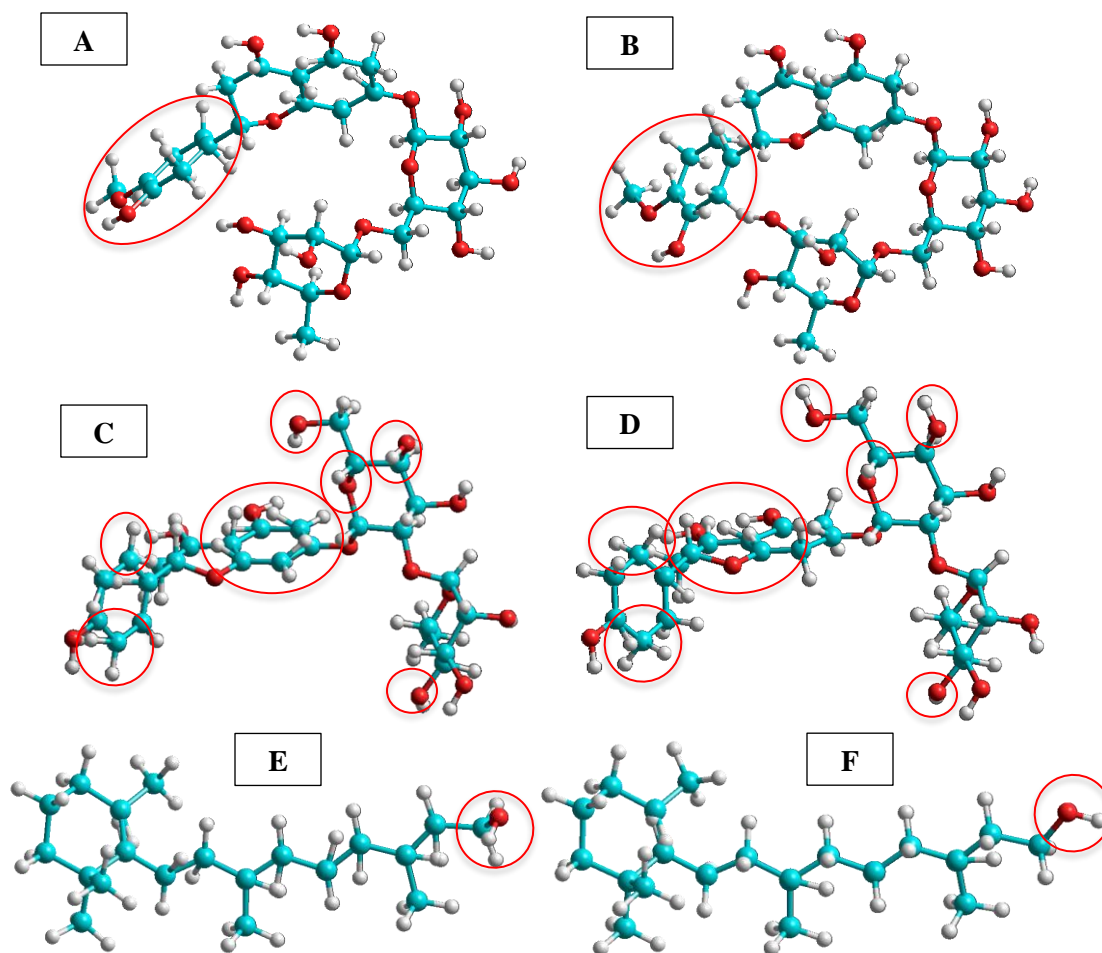
Photoaging disebabkan oleh ketidakseimbangan antara akumulasi dan degradasi komponen matriks ekstraseluler yang mengatur struktural dan fungsional pada jaringan kulit. Paparan sinar UV dari matahari secara terus menerus dalam jangka waktu tertentu menyebabkan produksi ROS sehingga mengaktifkan *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan faktor produksi MMP dalam fibroblast sehingga mensintesis *activator protein-1* (AP1) yang menginduksi sintesis *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) sebagai enzim yang berperan dalam degradasi kolagen tipe I [18]. Potensi hesperidin dan naringin sebagai agen anti *photoaging* dengan mekanisme penghambatan enzim MMP-1 diselidiki secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*.

Tahapan penelitian yang dilakukan diawali dengan penyiapan *database* senyawa uji hesperidin dan naringin serta kontrol positif retinol dan protein target MMP-1. Tahapan selanjutnya yaitu preparasi dan optimasi struktur tiga dimensi senyawa uji menggunakan program Hyperchem 8. Preparasi enzim MMP-1 sebagai protein target dilakukan dengan menggunakan program Chimera 1.11. Validasi metode *molecular docking* dan proses *docking* senyawa uji serta kontrol positif dengan enzim MMP-1 dilakukan dengan menggunakan aplikasi Autodock Tools 1.5.6 yang dilengkapi program Autodock 4 dan Autogrid 4. Data yang diperoleh dari proses *docking* berupa jenis dan energi ikatan yang selanjutnya dianalisis untuk dilakukan penarikan kesimpulan.

3.1 Optimasi Hesperidin dan Naringin 3D serta Kontrol Positif

Preparasi struktur senyawa uji (hesperidin dan naringin) dan kontrol positif (retinol) dimulai dengan mengubah format file senyawa dari *.sdf* menjadi *.pdb* dengan menggunakan aplikasi Open Babel Gui agar struktur hesperidin, naringin dan retinol dapat terbaca dalam program Hyperchem 8 untuk selanjutnya dilakukan optimasi struktur 3D dari senyawa uji dan kontrol positif. Optimasi senyawa dilakukan dengan metode perhitungan mekanika kuantum menggunakan metode semi empiris. Metode semi empiris yang digunakan adalah AM1 karena paling sering digunakan dan paling *reliable* pada program Hyperchem karena mampu menghitung sifat elektronik, total energi, optimasi geometri, dan pembentukan panas sehingga hasil yang diperoleh memberikan karakteristik senyawa hasil optimasi yang lebih mendekati karakteristik senyawa sintetis [19]. Kelebihan metode AM1 yakni dapat memprediksi ikatan hidrogen lebih baik dibandingkan dengan metode lainnya sehingga cocok diterapkan untuk senyawa organik. Metode AM1 juga memiliki keuntungan, yaitu dapat menghasilkan hasil yang sesuai dengan data eksperimen (*error* sekitar 5%) dan waktu pengerjaannya singkat [20].

Tahapan yang dilakukan untuk optimasi struktur 3D senyawa uji serta kontrol positif terdiri dari kalkulasi *single point* dan optimasi geometri. Kalkulasi *single point* dilakukan untuk menentukan energi total molekul pada struktur tanpa proses optimasi struktur senyawa uji. Sedangkan optimasi geometri dilakukan untuk meminimalisasi energi total, sehingga diperoleh struktur senyawa uji yang paling stabil, dilihat dari dengan penurunan energi total dari struktur senyawa uji [21]. Optimasi dari senyawa dinyatakan berhasil apabila terjadi penurunan nilai energi total senyawa dari kalkulasi *single point* ke optimasi geometri. Struktur 3D senyawa uji sebelum dan sesudah optimasi ditunjukkan pada gambar 3.

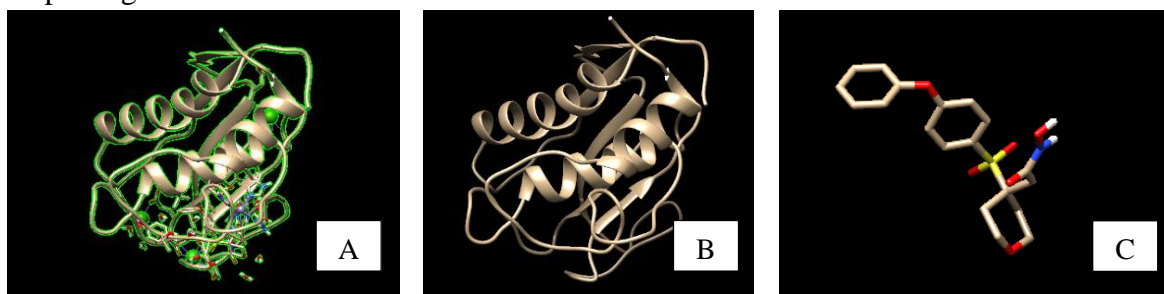


Gambar 3. Struktur Senyawa Hesperidin setelah Kalkulasi *Single Point* (a); Struktur Senyawa Hesperidin setelah Optimasi Geometri(b); Struktur Senyawa Naringin setelah Kalkulasi *Single Point* (c); Struktur Senyawa Naringin setelah Optimasi Geometri (d); Struktur Senyawa Retinol Setelah Kalkulasi *Single Point* (e); Struktur senyawa Retinol setelah Optimasi Geometri (f); warna biru = atom karbon; warna merah = atom oksigen; warna putih = atom hidrogen

Energi total yang dihasilkan dari kalkulasi *single point* senyawa hesperidin, naringin dan retinol secara berturut-turut yaitu -8019,863 kkal/mol, -7658,627 kkal/mol, dan -5057,943 kkal/mol. Hasil penurunan energi total yang diperoleh dari optimasi geometri senyawa hesperidin, naringin dan retinol secara berturut-turut yaitu -8057,022 kkal/mol, -7681,789 kkal/mol, dan -5072.282 kkal/mol. Optimasi dinyatakan berhasil, ditunjukkan dengan hasil optimasi geometri yang mampu meminimalisasi energi total senyawa uji, sehingga diperoleh struktur yang stabil dan energi yang lebih rendah. Semakin rendah nilai energi optimasi suatu senyawa maka menunjukkan interaksi gaya tarik antar atom semakin besar serta dapat memaksimalkan kemampuannya dalam mendonorkan elektron sehingga senyawa lebih mudah untuk berikatan dengan protein target, sedangkan gaya tolak antar atom semakin minimum sehingga konformasi senyawa uji yang diperoleh lebih stabil [19]. Struktur yang telah dioptimasi selanjutnya disimpan dalam format file .pdb dengan tujuan agar struktur senyawa uji dapat terbaca dalam program Autodock Tools 1.5.6 pada saat proses *docking*.

3.2 Preparasi Enzim MMP-1 sebagai Protein Target

Preparasi protein dilakukan terhadap struktur tiga dimensi protein target yakni enzim MMP-1 (PDB ID: 966C) yang diunduh dari situs <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Struktur protein yang diunduh merupakan struktur protein yang masih berikatan dengan *native* ligandnya, sehingga perlu dilakukan preparasi protein terlebih dahulu dengan menggunakan program *Chimera 1.11*. Preparasi protein ini bertujuan untuk memisahkan ligan asli dari protein target, sehingga menyediakan *pocket* atau tempat pengikatan yang akan digunakan selama proses *docking*. Tahapan dalam preparasi protein yaitu dengan memilih satu rantai protein target dengan tujuan mempermudah penentuan ruang koordinat *binding site* karena merupakan tempat senyawa uji berikatan saat proses *docking*. Pemilihan rantai didasarkan dari informasi tempat berikatannya *native ligand* yang memiliki aktivitas inhibisi dan merupakan senyawa organik pada protein. Enzim MMP-1 hanya memiliki 1 rantai yaitu rantai A sehingga untuk preparasi protein MMP-1 ini menggunakan rantai A. *Native ligand* pada rantai A yang memiliki mekanisme sebagai inhibitor dari enzim MMP-1 yaitu *N-hydroxy-2-[4-(4-phenoxy-benzenesulfonyl)-tetrahydro-pyran-4-yl]-acetamide* (PDB ID: RS2). Penggunaan satu rantai ini bertujuan untuk memudahkan dalam menentukan koordinat ruang (*pocket cavity*) ligan yang akan digunakan untuk *docking* [22]. Tahap preparasi protein target selanjutnya yaitu dilakukan penghilangan molekul air (H₂O) pada protein target yang telah dihilangkan *native ligandnya*. Molekul air pada protein target harus dihilangkan dengan tujuan untuk memaksimalkan interaksi senyawa uji dengan residu asam amino pada *binding site* protein sehingga dapat dipastikan yang berinteraksi hanya ligan dan protein tanpa gangguan molekul air [23]. Selain itu, juga dilakukan penghilangan residu atom kalsium (Ca) dan zink (Zn) agar diperoleh *native ligand* tanpa adanya residu. Proses preparasi protein target MMP-1 akan memperoleh hasil berupa struktur protein target tanpa *native ligand* dan struktur *native ligandnya* saja. Proses ini juga akan menyediakan tempat bagi senyawa uji untuk dapat dipasangkan dengan makromolekul dari protein target. Hasil dari preparasi protein target dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Enzim *Matrix metalloproteinase 1* (MMP-1) rantai A (A); Enzim *Matrix metalloproteinase 1* (MMP-1) tanpa *native ligand* (B); *Native Ligand* RS2 (C)

3.3 Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode merupakan tahap penting untuk menjamin metode yang digunakan dalam penelitian dapat diterima, tervalidasi, dan memenuhi syarat dalam penggunaannya. Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan penambatan ulang (*redocking*) *native ligand* dari protein target pada protein target yang telah dihilangkan *native ligandnya*. Proses *docking* ulang

dilakukan dengan metode semirigid dengan mengatur makromolekul bersifat rigid agar tidak terjadi perubahan bentuk *binding site* selama proses *redocking* sementara ligan akan bersifat fleksibel [23]. Proses *redocking* akan menghasilkan sepuluh konformasi dengan nilai energi ikatan dari terendah hingga tertinggi. Parameter validasi metode *molecular docking* adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) yakni nilai penyimpangan dari posisi ikatan *native ligand* dengan protein setelah proses *docking* terhadap posisi ikatan *native ligand* yang sebenarnya. Nilai RMSD akan menunjukkan kemiripan *native ligand* antara struktur kristalografi dengan eksperimental yang telah di-*docking* pada suatu protein. Metode *molecular docking* dianggap valid apabila nilai $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$ [17].

Validasi metode *molecular docking* diawali dengan memasukkan struktur enzim MMP-1 yang telah dipreparasi ke dalam aplikasi *AutoDock Tools* 1.5.6., selanjutnya dilakukan penambahan atom hidrogen pada protein target yang bertujuan untuk menambahkan valensi molekul sehingga ikatan hidrogen yang diperoleh optimum. Kemudian dilakukan *input ligand* yakni struktur 3 dimensi dari *native ligand*. Struktur ligan kemudian disimpan dalam format *.pdbqt* yang merupakan perpanjangan dari format *.pdb* yang digunakan untuk menentukan koordinat file meliputi perubahan parsial dan tipe atom serta memberikan informasi mengenai kebebasan torsi [24]. Tahapan berikutnya yakni dilakukan pengaturan *grid box* sebagai ruang untuk *native ligand* membentuk konformasi saat proses *docking* dengan protein target. Pada *grid box* ini, ligan atau senyawa uji akan melakukan konformasi sehingga akan terbentuk ikatan antara ligan atau senyawa uji dengan protein target yang mungkin berbeda untuk setiap konformasi. Ukuran *grid box* disesuaikan dengan ukuran *native ligand* dan juga senyawa uji sehingga dapat dipastikan bahwa posisi *native ligand* dengan posisi senyawa uji sudah berada di dalam *grid box*. Pengaturan *grid box* yang dilakukan meliputi penyesuaian ukuran koordinat *grid center* dan *grid size*. Pengaturan *grid size* bertujuan untuk menentukan besar kecilnya *grid box* yang meliputi size x, y, dan z serta pengaturan *grid center* untuk mengatur letak *grid box* protein target yang meliputi center x, y, z [19]. Nilai *grid box* yang digunakan dalam validasi penelitian ini ditampilkan pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaturan *Grid box* pada Protein Target

Protein Target	<i>Grid Size</i>	<i>Grid Center</i>
<i>Matrix metalloproteinase</i> 1 (MMP-1)	x= 40 y = 40 z= 40	x = 9,166 y= -10,353 z= 38,398

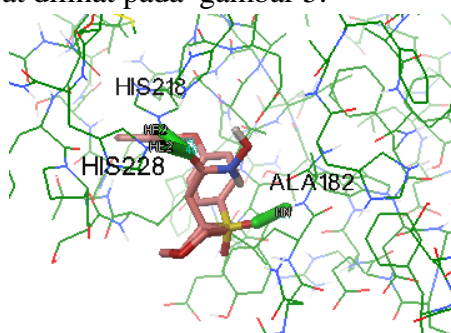
Proses *redocking* antara *native ligand* dengan enzim MMP-1 menghasilkan sepuluh konformasi terbaik, nilai RMSD, energi ikatan, dan residu asam amino yang membentuk ikatan hidrogen dengan *native ligand* ditunjukkan pada Tabel 2. Konformasi tiga dipilih karena merupakan konformasi dengan nilai RMSD terendah dan memenuhi persyaratan validasi ($RMSD \leq 2 \text{ \AA}$) yakni 1,05 Å. Berdasarkan hasil tersebut, metode yang digunakan dalam penelitian ini valid.

Tabel 2. Hasil *Redocking* antara Protein Target dengan *Native Ligand*

Konformasi	RMSD (Å)	Energi ikatan (kcal/mol)	Residu Asam Amino	Ikatan Hidrogen (Protein-Ligan)
1	1,07	-10,85	HIS222 HIS228 HIS218	HN-O25 O-HOX HE2-O38
2	2,40	-8,92	PRO238 ALA182	O-HOX HN-O25
3	1,05	-10,07	HIS218 HIS228 ALA182	HE2-O31 HE2-O31 HN-O25
4	1,07	-10,81	LEU181 HIS228 HIS218 ALA182 GLU219	HN-O26 HE2-O31 HE2-O31 HN-O25 OE2-HOX
5	2,45	-10,31	THR241 HIS228 GLU219	HN-O12 HE2-O31 OE2-HOX
6	2,57	-9,15	ALA182 PRO238 HIS228	HN-O25 O-HOX HE2-O38
7	1,06	-10,20	LEU181 HIS218 ALA182 GLU219	HN-O26 HE2-O31 HN-O25 OE2-HOX
8	2,04	-8,25	LEU181	HN-O38
9	1,09	-10,55	LEU181 HIS 228 HIS218 ALA182 GLU219	HN-O26 HE2-O31 HE2-O31 HN-O25 OE2-HOX

10	2,48	-8,26	HIS218 HIS228	HE2-O38 HE2-O38
----	------	-------	------------------	--------------------

Berdasarkan hasil *redocking*, diperoleh energi ikatan *native ligand* dengan protein MMP-1 sebesar -10,07 kkal/mol. Selain itu, diamati adanya residu yang membentuk ikatan hidrogen dengan *native ligand* yakni residu His218, His228, dan Ala182. Interaksi lain yang terdapat dalam *redocking* juga meliputi gaya *Van der Waals* dengan besar energi -12,08 kkal/mol dan interaksi elektrostatik dengan besar energi -0,08 kkal/mol. Namun, pada aplikasi *Autodock Tools 1.5.6* hanya dapat memvisualisasi ikatan hidrogen, sedangkan ikatan lainnya seperti *Van der Waals*, elektrostatik dan hidrofobik tidak divisualisasi. Visualisasi *native ligand* dengan protein target pada konformasi yang dipilih dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Visualisasi *native ligand* RS2 dengan enzim MMP-1

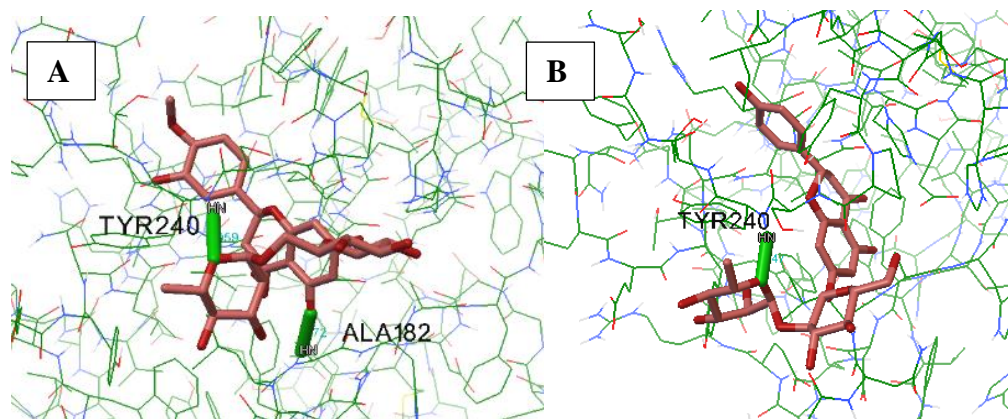
3.4 *Docking* Hesperidin, Naringin dan Retinol pada enzim MMP-1

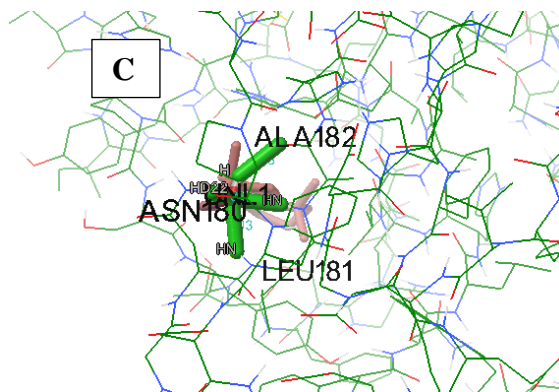
Docking senyawa hesperidin dan naringin serta kontrol positif retinol terhadap enzim MMP-1 dilakukan setelah validasi metode dinyatakan valid dengan parameter nilai $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$. Metode yang digunakan dalam *docking* hesperidin, naringin dan retinol sama dengan validasi metode, yaitu semirigid. Prosedur dalam *docking* senyawa uji pada protein target sama pada saat validasi yaitu menggunakan aplikasi *AutoDock Tools 1.5.6* yang dilengkapi dengan *AutoDock4* dan *Autogrid4*. *Docking* senyawa uji dilakukan pada *binding site* dari masing-masing protein target dengan menggunakan pengaturan *grid box* yang sama dengan proses validasi. Penggunaan *grid box* yang sama bertujuan untuk memastikan bahwa interaksi yang terjadi antara senyawa uji tepat terjadi pada *binding site* enzim MMP-1. Hasil yang diperoleh dari *docking* hesperidin, naringin dan retinol berupa energi ikatan dan jenis interaksi (ikatan hidrogen). Energi ikatan merupakan kalkulasi dari konformasi ligan yang terbentuk pada makromolekul saat kondisi ekuilibrium yang berkaitan dengan afinitas ligan terhadap protein target [19]. Nilai energi ikatan yang rendah menunjukkan kompleks ligan dan protein yang terbentuk stabil. Sedangkan nilai energi ikatan yang positif menandakan bahwa suatu sistem sangat sedikit atau bahkan tanpa kecenderungan terjadinya reaksi sehingga ikatan tidak terbentuk [25]. Berdasarkan hal tersebut dipilih konformasi senyawa uji yang memiliki energi ikatan terendah dan berinteraksi dengan residu asam amino pada *binding site*. Energi ikatan, jenis interaksi (ikatan hidrogen), dan residu yang membentuk ikatan hidrogen ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil *Docking Native Ligand*, Senyawa Uji dan Kontrol Positif dengan Protein Target

Protein Target	Ligand	Energi Ikatan (Kkal/mol)	Ikatan Hidrogen	Gugus (Protein-Ligan)
MMP-1	<i>Native ligand</i>	-10,07	HIS218 HIS228 ALA182	HE2-O31 HE2-O31 HN-O25
	Hesperidin	-11,73	ALA182 TYR240	HN-O HN-O
	Naringin	-10,96	TYR240	HN-O
	Retinol	-9,78	ASN180 LEU181 ALA182	HD22-O HN-O HN-O

Keseluruhan energi ikatan dari interaksi antara protein target MMP-1 dengan senyawa uji, kontrol positif, dan *native ligand*-nya bernilai negatif, sehingga senyawa tersebut memiliki afinitas terhadap enzim MMP-1. Afinitas dihasilkan oleh ikatan elektrostatis, semakin rendah nilai *binding affinity* maka afinitas antara protein target dengan ligan semakin tinggi, semakin tinggi nilai *binding affinity* maka afinitas antara protein target dengan ligan semakin rendah [26]. Hasil *docking* antara senyawa uji hesperidin dan naringin menunjukkan bahwa energi ikatan senyawa uji pada protein target lebih negatif dibandingkan energi ikatan *native ligand* dan kontrol positif retinol. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan antara senyawa uji dengan protein target lebih stabil dan lebih kuat dibandingkan ikatan antara *native ligand* dan retinol sehingga memiliki potensi yang lebih besar dalam menghambat proses *photoaging* pada kulit. Hesperidin dapat membentuk ikatan hidrogen dengan residu Ala218 dan Tyr 240 pada protein MMP-1. Atom H pada posisi N dari alanin urutan ke-218 dan tirosin ke-240 berinteraksi dengan gugus O dari hesperidin. Naringin membentuk ikatan hidrogen dengan residu Tyr240 yang mana atom H pada posisi N dari tirosin urutan ke-240 berinteraksi dengan gugus O dari naringin. Retinol membentuk ikatan hidrogen dengan residu Asn180, Leu181 dan Ala182. Visualisasi interaksi yang terjadi dapat dilihat pada gambar 6.





Gambar 6. Visualisasi hesperidin (A), naringin (B) dan retinol (C) terhadap protein target

4. KESIMPULAN

Senyawa uji hesperidin dan naringin menunjukkan afinitas yang lebih kuat dibandingkan dengan afinitas antara *native ligand* ($\Delta G = -10,07$ kkal/mol) dan kontrol positif retinol ($\Delta G = -9,78$ kkal/mol) terhadap enzim MMP-1 yang ditunjukkan oleh energi ikatan yang lebih negatif yaitu $-11,73$ kkal/mol dan $-10,96$ kkal/mol. Selain itu, hesperidin dan naringin mampu membentuk ikatan hidrogen dengan enzim MMP-1 dengan dengan residu asam amino berupa Ala218 dan Tyr 240 untuk hesperidin dan Tyr240 untuk naringin. Model interaksi yang terjadi adalah ikatan hidrogen, ikatan *Van der Waals*, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatik. Namun, pada aplikasi *AutoDockTools* 1.5.6 hanya dapat memvisualisasikan ikatan hidrogen pada residu asam amino *binding site*. Berdasarkan hasil *docking*, diketahui bahwa hesperidin dan naringin berpotensi sebagai agen *antiphotoaging* secara *in silico* melalui penghambatan enzim MMP- 1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dan memberi dukungan dalam penelitian dan penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] N. Dewi and N. Ginarsih, "Molecular *Docking* Ellagic Acid Sebagai Agen Anti-photoaging Secara In Silico," *Acta Holistica Pharm.*, vol. 3, no. 1, pp. 22–30, Jun. 2021, doi : -.
- [2] N. Jhawar, J. V. Wang, and N. Saedi, "Oral Collagen Supplementation for Skin Aging: A Fad or The Future?," *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 19, no. 4, pp. 910–912, Oct. 2020, doi: 10.1111/jocd.13096.
- [3] P. Pittayapruerk, J. Meehansan, O. Prapapan, M. Komine, and M. Ohtsuki, "Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.3390/ijms17060868.
- [4] W. Sari, L. Chiuman, S. F. Ginting, and C. N. Ginting, "Pengaruh Krim Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Kadar Kolagen dan Hidrasi Kulit pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Jantan yang Dipapar Sinar Ultraviolet-B," *Ber. Biol.*, vol. 19, no. 3A, Des. 2020, doi: 10.14203/beritabiologi.v19i3a.3863.
- [5] Z. Ahmad and Damayanti, "Penuaan Kulit : Patofisiologi dan Manifestasi Klinis," *Berk. Ilmu Kesehatan. Kulit dan Kelamin– Period. Dermatology Venereol.*, vol. 30, no. 03, pp. 208–

- 215, Des. 2018, doi : <https://doi.org/10.20473/bikk.V30.3.2018.208-215>.
- [6] C. Garg, P. Khurana, and M. Garg, “Molecular Mechanisms of Skin Photoaging,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 444–447, Apr. 2017, doi : .22377/ijgp.v11i02.1031.
- [7] M. Zasada and E. Budzisz, “Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments,” *Postep. Dermatologii i Alergol.*, vol. 36, no. 4, pp. 392–397, Aug. 2019, doi: 10.5114/ada.2019.87443.
- [8] D. Fauzia, “Aspek Farmakologi Retinoid pada Kosmeseutikal,” *J. Kesehat. Melayu*, vol. 1, no. 1, p. 35, Sep. 2017, doi: 10.26891/jkm.v1i1.2017.35-40.
- [9] Kemenkes RI, *Farmakope Herbal Indonesia Herbal*, 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017.
- [10] R. Singanusong, S. Nipornram, W. Tochampa, and P. Rattanatraiwong, “Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant,” *Food Anal. Methods*, vol. 8, no. 5, pp. 1112–1123, Sep. 2015, doi: 10.1007/s12161-014-9992-6.
- [11] I. Khasanah, M. Ulfah, and Sumantri, “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Dengan Metode Dpph (1,1-difenil-2-Pikrilhidrazil),” *J. Ilmu Farm. dan Farm. Klin.*, pp. 9–17, Des. 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.31942/jiffk.v11i2.1363>.
- [12] S. Hindun, T. Rusdiana, M. Abdasah, and R. Hindritiani, “Potency of Lemon Peel(*Citrus auronfolia*) waste as tirosinase inhibitor,” *Indones. J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 2, pp. 64-69, Jun. 2017, doi: <https://doi.org/10.15416/ijpst.v4i2.12642>.
- [13] H. J. Lee, A. R. Im, S. M. Kim, H. S. Kang, J. D. Lee, and S. Chae, “The flavonoid hesperidin exerts anti-photoaging effect by downregulating matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression via mitogen activated protein kinase (MAPK)-dependent signaling pathways,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2018, doi: 10.1186/s12906-017-2058-8.
- [14] R. Nilamber Lal Das, S. Muruhan, R. P. Nagarajan, and A. Balupillai, “Naringin prevents ultraviolet-B radiation-induced oxidative damage and inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in mouse embryonic fibroblast (NIH-3T3) cells,” *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 33, no. 3, pp. 1-11, Mar. 2019, doi: 10.1002/jbt.22263.
- [15] L. Pinzi and G. Rastelli, “Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, pp. 2-23, Sep. 2019, doi: 10.3390/ijms20184331.
- [16] N. Arya and D. A. Kaur, “Molecular Docking: A Review Paper,” *Int. J. Innov. Res. Eng. Manag.*, vol. 2, no. 6, pp. 140–146, Feb. 2022, doi: 10.55524/ijirem.2022.9.1.25.
- [17] I. W. Sari, J. Junaidin, and D. Pratiwi, “Studi Molecular Docking Senyawa Flavonoid Herba Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) pada Reseptor A-Glukosidase sebagai Antidiabetes Tipe 2,” *J. Farmagazine*, vol. 7, no. 2, pp. 54-60, Agu. 2020, doi: 10.47653/farm.v7i2.194.
- [18] O. Lestyning Ratri, T. Gusti Ebtavanny, and O. Eka Puspita, “Systematic Literature Review: Efektivitas Ekstrak Kopi sebagai Antioksidan dalam Mengatasi Photoaging,” *Pharm. J. Indones.*, vol. 7, no. 1, pp. 55–62, Des. 2021, doi: 10.21776/ub.pji.2021.007.01.9.
- [19] N. M. P. Susanti, N. P. L. Laksmiani, N. K. M. Noviyanti, K. M. Arianti, and I. K. Duantara, “Molecular Docking Terpinen-4-Ol Sebagai Antiinflamasi Pada Aterosklerosis Secara in Silico,” *J. Kim.*, pp. 221-228, Jul. 2019, doi: 10.24843/jchem.2019.v13.i02.p16.
- [20] P. A. Wright, A. Alex, and F. Pullen, “Predicting collision-induced dissociation spectra:

- Semi-empirical calculations as a rapid and effective tool in software-aided mass spectral interpretation,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 10, pp. 1127–1143, Feb. 2014, doi: 10.1002/rcm.6870.
- [21] K. D. Adnyani, L. W. E. Lestari, H. Prabowo, P. A. I. A. Siaka, and N. P. L. Laksmiani, “Aktivitas Dari Kuersetin Sebagai Agen Pencerah Kulit Secara in Silico,” *J. Kim.*, vol. 1, no. Trp 1, pp. 207-212, Jul. 2019, doi: 10.24843/jchem.2019.v13.i02.p14.
- [22] N. P. Linda Laksmiani, L. P. Febryana Larasanty, A. A. G. Jaya Santika, P. A. Andika Prayoga, A. A. I. Kharisma Dewi, and N. P. A. Kristiara Dewi, “Active compounds activity from the medicinal plants against SARS-CoV-2 using in silico assay,” *Biomed. Pharmacol. J.*, vol. 13, no. 2, pp. 873–881, Apr. 2020, doi: 10.13005/BPJ/1953.
- [23] D. H. Tjahjono and N. Hamzah, “Studi Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas, Fitur Farmakofor, dan *Docking* Molekuler Senyawa Turunan Pirazolo-[3,4-d]-pirimidin sebagai Inhibitor Mer Tirosin Kinase,” *Acta Pharm. Indones.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2013, doi: 10.5614/api.v38i1.5197.
- [24] G. M. Morris *et al.*, *User Guide AutoDock Version 4.2*, USA: Department of Molecular Biology, 2014.
- [25] A. Manna, M. D. Laksitorini, D. Hudiyanti, and P. Siahaan, “Molecular *Docking* of Interaction between E-Cadherin Protein and Conformational Structure of Cyclic Peptide ADTC3 (Ac-CADTPC-NH₂) Simulated on 20 ns,” *J. Kim. Sains dan Apl.*, vol. 20, no. 1, pp. 30–36, Apr. 2017, doi: 10.14710/jksa.20.1.30-36.
- [26] F. A. Makatita, R. Wardhani, and Nuraini, “Riset in silico dalam Pengembangan Sains di Bidang Pendidikan, Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana sebagai Agen Anti-Aging,” *J. ABDI*, vol. 2, no. 1, pp. 59–67, Jan. 2020, Available at: <https://journal.unhas.ac.id/index.php/kpiunhas/article/view/9086>.