



STUDI INTERAKSI MOLEKULAR SENYAWA HESPERIDIN DAN NOBILETIN KULIT BUAH JERUK TERHADAP ENZIM TYROSINASE SECARA IN SILICO

Sani Ega Priani*, Taufik Muhammad Fakhri

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung
Jl. Ranga Gading No. 8, Bandung 40116, Indonesia

Info Article

Submitted :

30 September 2020

Revised :

18 November 2020

Accepted :

25 November 2020

Corresponding Author :

Sani Ega Priani

Email :

egapriani@gmail.com

ABSTRAK

Kulit buah jeruk merupakan salah satu limbah yang belum banyak dimanfaatkan. Kulit buah jeruk diketahui mengandung banyak senyawa berkhasiat diantaranya adalah nobiletin dan hesperidin. Senyawa tersebut termasuk golongan senyawa flavonoid yang diketahui berpotensi menghambat enzim tyrosinase, suatu enzim yang mengkatalisis sintesis melanin. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa secara *in silico*, interaksi molekular antara senyawa flavonoid utama dari kulit buah jeruk yakni hesperidin dan nobiletin dengan enzim tirosinase dilihat dari parameter energi ikatan dan jenis ikatan yang terjadi. Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan diawali preparasi makromolekul enzim tyrosinase dan penetapan sisi aktifnya menggunakan tirosin sebagai substrat atau ligan alaminya. Selanjutnya dilakukan studi interaksi molekular antara senyawa nobiletin dan hesperidin terhadap sisi aktif enzim tirosinase dengan metode *molecular docking*. Hasil uji menunjukkan bahwa nobiletin dan hesperidin memiliki kemampuan untuk berikatan dengan sisi aktif enzim tirosinase dengan besar energi ikatan berturut-turut -6,24 dan -6,73 kkal/mol. Energi ikatan tersebut lebih kuat dibandingkan dengan energi ikatan antara substrat alami (tirosin) dengan sisi aktif enzim, yaitu sebesar -4,91 kkal/mol. Hesperidin dan nobiletin berinteraksi dengan sisi aktif enzim dengan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Nobiletin juga mampu berikatan dengan logam Cu yang ada pada sisi aktif enzim. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa nobiletin dan hesperidin berpotensi menjadi inhibitor kompetitif enzim tirosinase berdasarkan studi *in silico*.

Kata kunci: nobiletin, hesperidin, kulit jeruk, tyrosinase, *in silico*

Access this article



ABSTRACT

Citrus peels is the waste material that has not been widely used. Citrus peels is known containing many active compounds, including nobiletin and hesperidin. That compounds belong to a flavonoid class that potential to inhibit tyrosinase enzyme that catalyzes the syntesis of melanin in the skin. The aims of this study is to analyze molecular interactions between the flavonoid compounds of citrus peels, hesperidin and nobiletin, with the tyrosinase enzyme using molecular docking methods. The research

was carried out by *in silico* study. Macromolecular model of the tyrosinase enzyme was prepared and followed by determining the active site of the enzyme using tyrosine as its natural ligand. Furthermore, the study of molecular interactions between nobiletin and hesperidin on the active site of the tyrosinase enzyme was carried out using the molecular docking method. The results showed that nobiletin and hesperidin had an ability to bind to the active site of the enzyme with free binding energies are -6.24 and -6.73 kcal /mol. The binding energies of the compounds to active site of the enzyme are better compared with the natural ligand (tyrosine), which is -4.91 kcal / mol. Hesperidin and nobiletin interact with the active site of the enzyme by hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Nobiletin is also able to bind with Cu ion which is on the active site of the enzyme. From these results, it can be concluded that the nobiletin and hesperidin could be act as competitive inhibitors of the tyrosinase enzyme based on *in silico* study.

Keywords: nobiletin, hesperidin, citrus peel, tyrosinase, *in silico*

1. PENDAHULUAN

Jeruk merupakan salah satu tanaman buah dunia yang paling diminati, mengandung banyak senyawa aktif yang baik untuk kesehatan. Jeruk diketahui mengandung vitamin C, asam folat, kalium dan pektin. Selain itu buah jeruk diketahui mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti polifenol dan flavonoid yang membuatnya memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Sidana *et al*, 2013). Produksi jeruk di Indonesia sendiri sangat tinggi, menurut data diketahui pada tahun 2020 produksi jeruk di Indonesia dapat mencapai angka 3 juta ton setahun. Tingginya produksi dan konsumsi buah jeruk tersebut menyebabkan tingginya juga limbah yang dihasilkan, yakni bagian kulit buahnya. Bagian kulit buah jeruk belum dimanfaatkan secara optimal, padahal beberapa penelitian menunjukkan banyaknya senyawa berkhasiat yang terkandung dalam kulit buahnya.

Kulit jeruk kaya akan bahan fungsional seperti minyak esensial (0,6 -

1%), serat (6,30-42,13 %), fenol (0,67-19,62 %), dan vitamin C (0,109 -1,150 %). Senyawa fenolik utama yang terkandung dalam kulit buah jeruk adalah flavanon (hesperidin, neohesperidin, narirutin, dan naringin) dan flavon terpolimetoksilasi (nobiletin, sinensetin, tangeretin). Kandungan senyawa fenolik dari kulit buah jeruk menyebabkan munculnya banyak aktivitas farmakologi seperti antioksidan, anti-inflamasi, anti-kanker, anti-proliferasi, anti-virus, dan anti agregasi platelet (Mhiri *et al*, 2013; Rafiq *et al*, 2018, Koolaji *et al*, 2020).

Kandungan senyawa-senyawa flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk membuatnya potensial dikembangkan menjadi senyawa aktif dalam produk kosmetika. Salah satu aktivitas yang sering dimiliki oleh senyawa-senyawa flavonoid adalah aktivitas inhibitor enzim tirosinase (Sohretoglu *et al*, 2018). Enzim tirosinase adalah suatu enzim yang mengkatalisis proses pembentukan atau sintesis melanin di kulit. Penggunaan senyawa-senyawa yang memiliki

kemampuan menghambat kerja enzim ini, dapat membantu mengatasi kondisi hiperpigmentasi kulit. Hiperpigmentasi adalah suatu kondisi dimana terjadinya produksi pigmen kulit/melanin yang berlebihan, sehingga dapat menjadi masalah penting terutama untuk kaum wanita. Senyawa flavonoid diketahui dapat menjadi inhibitor kompetitif enzim tyrosinase karena kemampuannya untuk berikatan dengan sisi aktif enzim (Chang, 2009; Sarkar *et al*, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui interaksi molekular antara dua senyawa flavonoid utama yang terkandung dalam kulit buah jeruk yakni hesperidin dan nobiletin dengan sisi aktif enzim tirosinase. Pengujian akan dilakukan secara *in silico* sehingga dapat ditentukan kekuatan ikatan yang terbentuk dan juga dapat diketahui jenis ikatan yang terjadi serta komponen komponen yang terlibat dalam interaksi tersebut.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Preparasi Makromolekul Enzim dan Senyawa Uji

Struktur kristal makromolekul enzim tyrosinase yang telah diunduh dari web Protein Data Bank dengan kode PDB 6JU9 selanjutnya dipreparasi terlebih dahulu dengan menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2. Preparasi makromolekul enzim ini dilakukan dengan menghilangkan molekul air dan ligan alami, kemudian dilanjutkan dengan menambahkan atom hidrogen polar dan menghitung muatan parsial Kollman. Senyawa uji yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah hesperidin dan nobiletin. Struktur molekul senyawa diperoleh dari web Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Kemudian, dilakukan preparasi terhadap senyawa uji dengan menambahkan atom hidrogen polar dan menghitung muatan parsial Gasteiger. Preparasi molekul senyawa dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2. Struktur yang telah dipreparasi selanjutnya akan digunakan sebagai input untuk simulasi penambatan molekuler.

2.2 Identifikasi Sisi Aktif Makromolekul Enzim

Makromolekul enzim yang telah dipreparasi kemudian diidentifikasi, dievaluasi, dan dieksplorasi bagian sisi aktif pengikatan yang berperan terhadap aktivitas inhibitor tyrosinase dengan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio 2020. Molekul tirosin yang berperan sebagai ligan alami dari makromolekul enzim tirosinase digunakan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi area sisi aktif dari makromolekul enzim tersebut.

2.3 Simulasi Penambatan Molekuler

Simulasi penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2 untuk mengamati dan mengidentifikasi afinitas dan interaksi yang terjadi antara makromolekul enzim tirosinase dengan hesperidin dan nobiletin. Jarak antara bagian permukaan makromolekul enzim dan molekul senyawa uji dibatasi dengan batas radius maksimum 0,375 Å. Semua simulasi dilakukan menggunakan ukuran *grid box* 64 x 60 x 60, selanjutnya digunakan metode *Lamarckian Genetic Algorithm* dengan 100 konformasi. Hasil penambatan molekuler kemudian dilakukan identifikasi dan evaluasi terhadap interaksi molekuler yang terjadi

antara makromolekul enzim tirosinase dengan molekul senyawa uji berdasarkan nilai energi bebas ikatan. Residu asam amino yang berperan dalam interaksi molekuler yang terbentuk diamati dengan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio 2020 (Cenol *et al*, 2014).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Enzim tirosinase diketahui sebagai suatu enzim yang mengkatalisis proses melanogenesis. Proses melanogenesis adalah suatu proses sintesis melanin atau pigmen kulit. Melanogenesis dimulai dengan tahap oksidasi tirosin menjadi dopaquinone yang dikatalisis langsung oleh enzim tirosinase. Melanin berperan penting dalam melindungi kulit manusia dari efek berbahaya radiasi UV dari matahari. Melanin juga menentukan

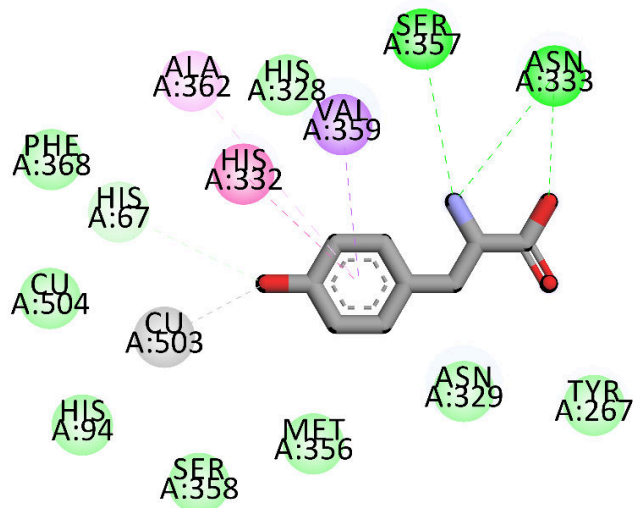
penampilan fenotipik kita. Pada kondisi kondisi tertentu dapat terjadi proses produksi melanin yang berlebihan yang disebut dengan kondisi hiperpigmentasi. Untuk mengatasi kondisi tersebut umum digunakan senyawa-senyawa yang mampu menghambat kerja enzim tirosinase sehingga menghambat pula sintesis melanin (Chang, 2012). Senyawa senyawa yang mampu berikatan dengan sisi aktif enzim berpotensi untuk dikembangkan sebagai inhibitor enzim tirosinase. Salah satu cara untuk mengetahui keberadaan interaksi antara senyawa uji dengan enzim adalah dengan studi *in silico* (Asazdeh *et al*, 2015). Berikut hasil studi yang menggambarkan struktur enzim tyrosinase yang diketahui mampu membentuk kompleks dengan tirosin (**Gambar 1**).



Gambar 1. Struktur makromolekul enzim tyrosinase (dalam kompleks dengan tirosin).

Selanjutnya dilakukan uji untuk mengetahui sisi aktif enzim tirosinase. Untuk dapat menentukan bagian sisi aktifnya, digunakan molekul tirosin yang merupakan substrat atau ligan alami dari enzim tirosinase pada proses

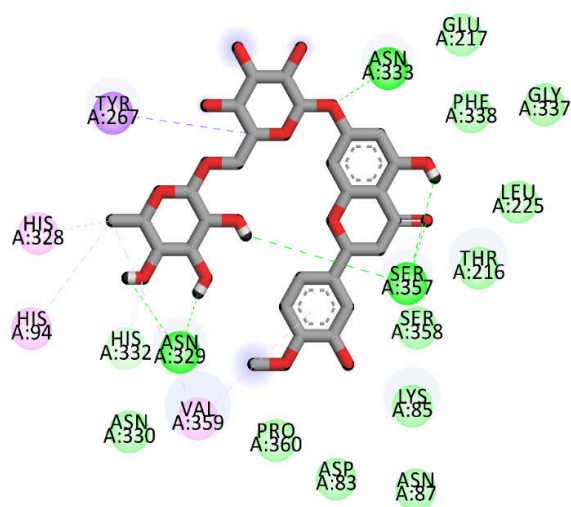
melanogenesis. Hasil uji dapat dilihat pada **Gambar 2**. Dari gambar tersebut dapat terlihat bentuk interaksi yang terjadi antara senyawa aktif dengan tirosin, beserta asam amino serta atom yang terlibat dalam interaksi.



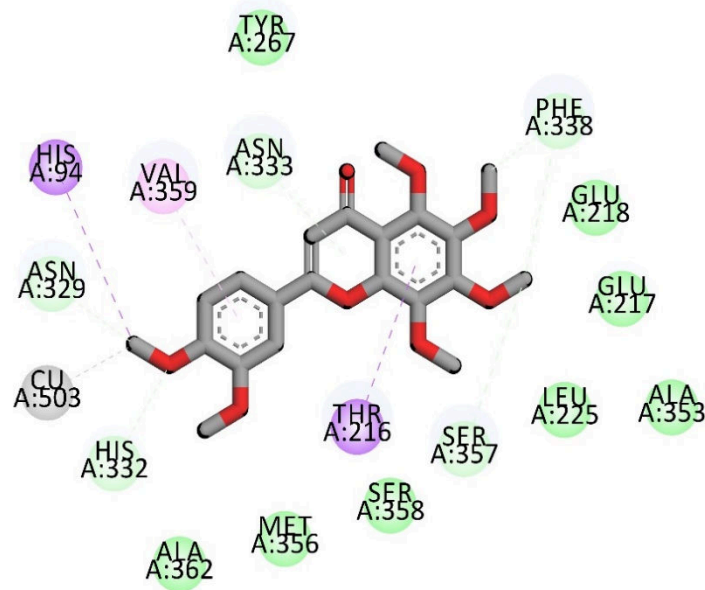
Gambar 2. Hasil analisis sisi aktif enzim tirosinase yang berikatan dengan tirosin.

Setelah diketahui bagian sisi aktif dari enzim tirosinase tersebut, maka dilanjutkan dengan uji penambatan molekular untuk melihat kemampuan ikatan dari senyawa hesperidin dan nobiletin terhadap bagian sisi aktif tersebut. Hesperidin merupakan flavonoid jenis flavanon dalam bentuk glikosida. Nobiletin masuk golongan flavonoid yang berada dalam bentuk polimetoksilflavon. Hesperidin dan nobiletin ditemukan pada berbagai jenis kulit buah jeruk baik jeruk manis (*Citrus sinensis*), jeruk keprok (*Citrus reticulata*), jeruk bali (*Citrus maxima*), jeruk

nipis (*Citrus aurantifolia*), dll. (Chen *et al*, 2020; Sharma *et al*, 2013). Senyawa hesperidin dan nobiletin ini kemudian dilakukan uji *in silico* untuk mengetahui kemampuan senyawa tersebut untuk berikatan atau berinteraksi dengan sisi aktif enzim tirosinase. Hasil uji diperlihatkan pada **Gambar 3** dan **Gambar 4**. Dari hasil visualisasi dapat diketahui bahwa senyawa hesperidin dan nobiletin mampu berikatan dengan bagian sisi aktif enzim tirosinase pada sisi yang sama dengan tirosin, sebagai ligan alaminya.



Gambar 3. Interaksi molekular antara hesperidin dengan sisi aktif enzim tirosinase.



Gambar 4. Interaksi molekular antara nobiletin dengan sisi aktif enzim tyrosinase.

Selanjutnya dilakukan evaluasi interaksi antara senyawa hesperidin dan nobiletin dengan sisi aktif enzim tyrosinase. Evaluasi yang dilakukan untuk

mengetahui nilai energi bebas ikatan dan juga jenis ikatan yang terjadi. Hasilnya ditampilkan pada **Tabel 1** dan **Tabel 2**.

Tabel 1. Energi bebas ikatan hasil simulasi penambatan molekuler.

Nama Senyawa	Nilai Energi Bebas Ikatan (kcal/mol)
Tirosin	-4,91
Hesperidin	-6,73
Nobiletin	-6,24

Dari hasil pada **Tabel 1** terlihat nilai energi bebas ikatan yang terbentuk antara tirosin sebagai ligan alami dan senyawa uji yakni hesperidin dan nobiletin dengan sisi aktif enzim tirosinase. Dari hasil yang diperoleh diketahui bahwa ikatan antara hesperidin dan nobiletin dengan sisi aktif enzim tirosinase lebih kuat jika dibandingkan dengan tirosin sebagai ligan

alami. Hal tersebut disebabkan karena, semakin negatif nilai energi bebas ikatan, semakin kuat ikatan yang terbentuk. Dapat diprediksi bahwa hesperidin dan nobiletin mampu berkompetisi dengan tirosin dalam penempatan sisi aktif sehingga potensial menjadi inhibitor enzim tirosinase.

Tabel 2. Energi bebas ikatan hasil simulasi penambatan molekuler.

Nama Senyawa	Jumlah Interaksi	Interaksi hidrofobik	Ikatan hidrogen	Ikatan dengan Cu
Tirosin (ligan alami)	7	His332, Val 359	His67, Asn333, Ser357	Ada
Hesperidin	13	His94, Tyr267, His328, Val359	Asn329, His332, Asn333, Ser357	Tidak
Nobiletin	10	His94, Thr216, Val359	Asn329, His332, Asn333, Phe338, Ser357	Ada

Dari hasil pada **Tabel 2**, ada tiga jenis interaksi yang dapat terjadi yakni interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan ikatan dengan Cu. Dilihat dari jumlah interaksinya hesperidin memiliki jumlah interaksi yang paling banyak dibandingkan dengan tirosin dan nobiletin, sehingga memiliki energi bebas ikatan paling negatif. Namun baik tirosin dan nobiletin memiliki ikatan/interaksi selain interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen, yakni ikatan dengan logam Cu. Enzim tirosinase merupakan metaloenzim yang mengandung logam Cu. Beberapa senyawa flavonoid diketahui bisa menjadi *copper chelator* yang mampu berikatan dengan Cu pada sisi aktif enzim, yang dapat mendukung kemampuannya untuk menginhibisi enzim tirosinase. Untuk senyawa hesperidin yang tidak dapat berinteraksi dengan Cu pada sisi aktif enzim, pada penelitian lanjutan perlu dilakukan modifikasi struktural dengan metode HKSA (hubungan kuantitatif struktur aktivitas) agar dihasilkan senyawa turunan yang memiliki kemampuan sebagai *copper chelator* (Samaneh *et al*, 2018).

Dari hasil penelitian diketahui bahwa baik senyawa hesperidin ataupun nobiletin menurut uji secara *in silico* dapat menjadi inhibitor kompetitif enzim tirosinase, karena mampu berikatan pada

sisi aktif yang sama dengan tirosin. Hal ini membuat limbah kulit buah jeruk yang mengandung senyawa hesperidin dan nobiletin berpotensi digunakan sebagai agen inhibitor tyrosinase yang salah satunya dapat dikembangkan menjadi kosmetika mengatasi kondisi hiperpigmentasi kulit.

4. KESIMPULAN

Senyawa hesperidin dan nobiletin mampu berikatan dengan sisi aktif enzim tirosinase dengan besar energi ikatan berturut turut -6,73 dan -6,24 kkal/mol, lebih negatif dibandingkan energi ikatan tirosin sebagai ligan alami yang artinya menggambarkan ikatan senyawa uji yang lebih kuat. Senyawa hesperidin membentuk ikatan dengan sisi aktif enzim dengan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik sedangkan senyawa nobiletin berikatan dengan ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan ikatan dengan logam Cu+.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Prodi Farmasi UNISBA yang membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Asadzadeh A, Fassihi A, Yaghmaei P, Pourfarzam., 2015. In Silico Approach for Designing Potent Inhibitors against Tyrosinase, *Biosciences*, **12**: 181-187.
- Chang TS., 2009. An updated review of

- tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sc*, **10**(6): 2440-75.
- Chang TS., 2012. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials (Basel)*, **5**(9):1661-85.
- Chen Q, Wang D, Tan C, Hu Y, Sundararajan B, Zhou Z., 2010. Profiling of Flavonoid and Antioxidant Activity of Fruit Tissues from 27 Chinese Local Citrus Cultivars. *Plants (Basel)*. **9**(2):196.
- Huang H, Li L, Shi W, Liu H, Yang J, Yuan X, Wu L., 2016. The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites *In Vivo* and *In Vitro*, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2016**; 1-14.
- Jaspreetkaur S., Vipin S., Sumitra D., Parminder N., Suman B., 2013. A Review on Citrus "The Boon of Nature", *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, **18**(2): 20-27.
- Koolaji N, Shammugasamy B, Schindeler A, Dong Q, Dehghani F, Valtchev P., 2020. Citrus Peel Flavonoids as Potential Cancer Prevention Agents. *Curr Dev Nutr*. **4**(5).
- M'hiri N., I. Ioannou, M. Ghoul, N. Mihoubi Boudhrioua, 2017. Phytochemical characteristics of citrus peel and effect of conventional and nonconventional processing on phenolic compounds: A review, *Food Reviews International*, **33**(6): 587-619
- Rafiq, S., Rajkumari K, Sofi A., Nadia B, Fiza N, Gulzar AN, 2018. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, **17**(4): 351-358.
- Samaneh Z, Asieh B, Mahmud THK, Munoz M, Garcia M, Garcia C, Ali AS., 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **34**(1): 279-309.
- Sarkar R, Arora P, Garg KV., 2013. Cosmeceuticals for Hyperpigmentation: What is Available, *J Cutan Aesthet Surg*, **6**(1):4-11.
- Senol FS, Khan MT, Orhan G, Gurkas E, Orhan IE, Oztekin NS, Ak F., 2014. In silico approach to inhibition of tyrosinase by ascorbic acid using molecular docking simulations. *Curr Top Med Chem*. **14**(12):1469-72.
- Sharma P, Pandey P, Gupta R, Roshan S, Garg A, Shukla A, Pasi A, 2013. Isolation and characterization of hesperidin from orange peel. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2013:3892-3897.
- Sohretoglu D., Burak B., Arzu O., 2018. Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies, *Bioorganic Chemistry*, **81**(1): 168-174



Copyright © 2020 The author(s). You are free to **Share** — copy and redistribute the material in any medium or format. **Adapt** — remix, transform, and build upon the material. Under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use. **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes. **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. **No additional restrictions** — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.