

IDENTIFIKASI SENYAWA PADA BATANG KROKOT (*PORTULACA OLERACEA* L.) DAN POTENSINYA SEBAGAI AKTIVATOR SUPEROKSIDA DISMUTASE *IN SILICO*

Cika Hilda Fransiski ¹, Djarot Sasongko Hami Seno ², Mega Safithri ³*

¹Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Bogor, Indonesia

*Korespondensi: safithri@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Enzim superoksida dismutase (SOD) memiliki fungsi sebagai antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas di dalam tubuh. Meskipun krokot telah terbukti memiliki sifat antioksidan, belum ada penelitian mengenai apakah batang krokot dapat meningkatkan aktivitas SOD dan jenis senyawa yang terlibat dalam peningkatan aktivitas tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi potensi batang krokot sebagai peningkat aktivitas SOD dan jenis senyawa pada batang krokot yang berperan dalam peningkatan aktivitas tersebut melalui penambatan molekuler dengan reseptor SOD PDB ID 1CB4. Penelitian ini melibatkan identifikasi senyawa pada batang krokot menggunakan teknik LC-MS/MS QTOF, prediksi bioavailabilitas dan toksisitas, serta penambatan molekuler. Hasil penambatan molekuler dievaluasi melalui parameter energi bebas Gibbs (ΔG), konstanta disosiasi (K_d), dan residu yang terikat antara reseptor dan ligan. Berdasarkan hasil penelitian, *xanthosine* merupakan senyawa dengan potensi terbaik dalam meningkatkan aktivitas SOD dengan nilai (ΔG) sebesar -7,00 kkal/mol dan K_d sebesar 7,37 μM . Selain itu, *xanthosine* terikat pada situs aktivator alosterik enzim berdasarkan identifikasi residu yang terikat antara reseptor dan ligan. Berdasarkan hasil penelitian, batang krokot berpotensi menjadi aktivator superoksida dismutase secara *in silico*.

Kata kunci: Antioksidan, Batang Krokot, Penambatan Molekuler, Superoksida Dismutase

ABSTRACT

Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that acts as an antioxidant in the human body. Antioxidants can counteract free radicals in the body. Although purslane has been shown to have antioxidant properties, it is uncertain whether the stems of the plant can increase SOD activity and what types of compounds are involved in this process. This study was conducted to examine the potential of purslane stems to increase SOD activity and the compounds in purslane stems that contribute to this activity through molecular binding to the SOD PDB ID 1CB4 receptor. The study involved the analysis of compounds in purslane stems using LC-MS/MS QTOF, followed by the prediction of their bioavailability and toxicity, and then molecular docking. The results were analyzed using Gibbs free energy (ΔG), dissociation constant (K_d), and binding residue between the receptor and the ligand. Xanthosine was found to be the best candidate for increasing SOD activity, with a value of (ΔG) of -7.00 kcal/mol and a K_d of 7.37 μM . Additionally, the residue binding analysis indicated that xanthosine binds to the allosteric sites of the enzyme activator. Therefore, it can be concluded that the stems of purslane have the potential to activate superoxide dismutase *in silico*.

Keywords: Antioxidant, Molecular Docking, Purslane Stems, Superoxide Dismutase

PENDAHULUAN

Krokot (*Portulaca oleracea* L.) adalah tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan masih dianggap sebagai gulma atau tanaman liar di Indonesia.

Penelitian [1] menyatakan bahwa krokot yang sudah dewasa memiliki total fenolik dan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan krokot yang masih muda. Krokot jenis *Portulaca grandiflora* Hook. memiliki aktivitas antioksidan sedang pada batang yang sudah tua dengan LC50 sekitar 100-150 ppm [2]. Senyawa oleracein C, D, dan E pada krokot memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan butylated hydroxyanisole [3]. Pengujian aktivitas antioksidan krokot dilakukan secara *in vitro* melalui metode 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) dan *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Suhu ekstraksi sampel sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pemanasan pada proses ekstraksi dapat menurunkan aktivitas antioksidan sampel [4]. Konsumsi sayuran yang memiliki aktivitas antioksidan dapat merangsang produksi antioksidan enzim dalam tubuh, seperti superoksida dismutase.

Superoksida dismutase (SOD) adalah suatu enzim yang membantu memecah molekul oksigen yang berpotensi berbahaya bagi sel. Fungsinya adalah untuk mencegah kerusakan sel. SOD termasuk ke dalam golongan metaloenzim dan dapat ditemukan pada semua sel hidup [5]. Radikal bebas yang muncul dari metabolisme tubuh, salah satunya adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS), dapat diatur kadarnya oleh enzim SOD. Enzim SOD mengkatalisis dismutasi dua molekul anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen (O_2). Sehingga anion superoksida yang berbahaya dapat menjadi lebih aman [6].

Belum ada pengujian mengenai aktivitas enzim SOD pada batang krokot, meskipun beberapa penelitian menunjukkan bahwa krokot memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Oleh karena itu, dilakukan penelitian *in silico* untuk mengevaluasi potensi batang krokot terhadap aktivitas enzim SOD. Pendekatan *in silico* menggunakan metode komputasi yang memungkinkan prediksi cepat untuk sejumlah besar senyawa dengan tingkat keluaran yang tinggi. Keuntungan lain dari metode *in silico* adalah kemampuannya untuk membuat prediksi berdasarkan struktur senyawa sebelum senyawa tersebut disintesis. Oleh karena itu, metode *in*

silico dapat digunakan pada tahap awal pengembangan obat. Selain itu, dalam penelitian ini dilakukan identifikasi senyawa dalam batang krokot menggunakan LC-MS/MS QTOF untuk mengetahui komponen-komponen yang ada dalam batang krokot.

METODE PENELITIAN

Bahan: Krokot (*Portulaca oleracea* L.), akuades, struktur 3D enzim superoksida dismutase yang diambil dari basis data RSCB Protein Data Bank dengan kode PDB ID 1CB4 dalam format .pdb. Ligan uji dari senyawa krokot (*P. oleracea* L.) dalam format .sdf dan ligan pembanding beta amylin dalam format .sdf juga digunakan.

Alat: Oven, blender, panci, kompor, botol gelap, wadah plastik, saringan, LC-MS/MS QTOF, laptop Acer A314-22 dengan spesifikasi prosesor AMD Athlon 3020e, RAM 8GB DDR4, dan sistem operasi Windows 11. Selain itu, simulasi penambatan molekuler dilakukan menggunakan beberapa perangkat lunak seperti *YASARA Structure*, *Discovery Studio Visualizer*, dan *PyMOL*.

Metode

Identifikasi Krokot

Krokot yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah. Sebelum digunakan, spesies krokot harus diidentifikasi terlebih dahulu untuk memastikan keakuratan penelitian. Identifikasi dilakukan dengan mengirimkan sampel krokot ke Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

Preparasi Sampel Krokot

Krokot yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah dan bagian tanaman yang digunakan adalah batang. Batang krokot yang dipilih kemudian dibersihkan dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu 50°C selama 2-3 hari. Setelah itu, batang krokot yang telah kering dihaluskan menggunakan blender. Simplisia batang krokot yang sudah halus dimasukkan ke dalam wadah plastik dan diikat kuat, kemudian disimpan pada suhu ruang.

Maserasi Krokot

Teknik maserasi yang digunakan pada batang krokot adalah perebusan. Sebanyak 30 gram simplisia batang krokot dilarutkan dalam 600 mL akuades dengan perbandingan 1:20. Kemudian direbus dengan suhu 100 °C selama 30 menit menggunakan kompor.

Setelah itu, hasil rebusan disaring dan dikonsentrasikan menggunakan Vacuum Rotary Evaporator dengan suhu 50 °C.

Untuk menghitung rendemen batang krokot hasil maserasi, digunakan rumus:

$$\text{Rendemen Ekstrak (\%)} = \frac{\text{Bobot Ekstrak (g)}}{\text{Bobot Simplisia (g)}} \times 100\%$$

Identifikasi Senyawa pada Batang Krokot menggunakan LC-MS/MS QTOF

Sampel yang telah melalui rotary evaporator diuji menggunakan teknik LC-MS/MS QTOF. Pada teknik ini, fase gerak cair dialirkan melalui kolom dan cuplikan dimasukkan ke dalam fase gerak melalui penyuntikan. Setiap komponen pada sampel dipisahkan dalam kolom, dimana komponen dengan interaksi lebih lemah dengan fase diam akan keluar dari kolom lebih dulu dibandingkan dengan komponen dengan interaksi yang lebih kuat. Kemudian, detektor akan mendeteksi keluarnya setiap larutan dan merekam hasilnya dalam bentuk kromatogram.

Preparasi Struktur dan Identifikasi Stabilitas Ligan

Untuk mempersiapkan struktur ligan, digunakan perangkat lunak YASARA Structure. Seluruh ligan diunduh dari database PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dalam struktur 3D dengan format .sdf. Setelah membuka perangkat lunak YASARA Structure, klik "File" > "Load" > "Other format" > Pilih "sdf - MDL MOLL" pada kolom format dan pilih file .sdf senyawa ligan yang akan dikonversi. Kemudian, ion hidrogen ditambahkan dengan cara klik "Edit" > "Clean" > "All". Geometri ligan dioptimasi dengan mengklik "Option" > "Choose Experiment" > "Energy minimization" sehingga akan muncul simCell di sebelah kanan. Proses minimisasi dilakukan sebanyak 3x ulangan. Ligan hasil minimisasi disimpan dalam format .pdb dengan cara klik "File" > "Save as" > "PDB file" > pilih: Sequence 1: "Nama Ligan" > "Rename senyawa ligan tersebut". Setelah itu, ligan dibuka kembali pada perangkat lunak YASARA Structure dan disimpan dalam format .sdf. Untuk mengidentifikasi bioavailabilitas ligan-ligan tersebut berdasarkan aturan Lipinski, digunakan situs web <http://www.scfbio-uitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>.

Prediksi Toksisitas Ligan

Cara memprediksi toksisitas ligan uji adalah dengan menggunakan webserver ProTox II.

Pertama-tama, ligan uji diunduh dari laman PubChem dalam format SMILES. Kemudian, struktur ligan uji dengan format SMILES tersebut diunggah ke laman https://tox-new.charite.de/prottox_II/. Untuk menguji toksisitas, pilih "Predict" dan hasilnya akan ditampilkan dalam beberapa saat.

Preparasi Struktur Reseptor

Untuk mempersiapkan reseptor, kita perlu mengunduhnya dari website RSCB Protein Data Bank www.rcsb.org/pdb dengan menggunakan kode PDB ID 1CB4. Selanjutnya, enzim SOD yang dipilih memiliki resolusi 2,30 Å. Untuk mempersiapkan reseptor, molekul air harus dihapus dengan mengklik "Edit" > "Delete" > "Waters". Ion hidrogen kemudian ditambahkan dengan mengklik "Edit" > "Clean" > "All". Antarmolekul juga harus dipisahkan dengan mengklik "Edit" > "Split" > "All" > pilih "Do Not..." dan "Keep current object..." > "Split at all molecules". Untuk menampilkan ion hidrogen pada gugus fungsi tertentu, klik "View" > "Hide atoms" > "Aliphatic hydrogens". Setelah itu, hasil persiapan dapat disimpan dalam format .pdb pada folder kerja. Akhirnya, stabilitas reseptor dapat diidentifikasi menggunakan diagram Ramachandran.

Validasi Gridbox

Validasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak YASARA structure. Pada validasi ini, reseptor superoksida dismutase (SOD) dengan kode PDB ID 1CB4 tidak memiliki ligan alami yang terikat pada strukturnya. Validasi gridbox dilakukan dengan membuat gridbox di sekitar residu sisi pengikatan ligan pada reseptor. Gridbox dibuat dengan rentang 0.5 - 5.0Å dan selisih 0.5Å.

Penambatan Molekuler

Ligan uji dan reseptor dalam format .pdb harus diubah ke dalam format .scene. Kemudian, pada opsi "macro & movie" pilih "macro" dan jalankan "dock_runscreen.mcr".

Hasil penambatan molekuler dapat dibaca dalam format .log di folder kerja. Untuk mengidentifikasi interaksi hidrogen dan

Selanjutnya, untuk melakukan visualisasi 3D, gunakan perangkat lunak Pymol.

hidrofobik dari hasil penambatan, gunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar $9,95 \pm 0,015$. Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa krokot, digunakan metode LC-MS/MS QTOF. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa krokot mengandung 14

Beberapa senyawa yang tercatat dalam tabel berwarna kuning tidak memiliki kode CID dan tidak terdaftar dalam Bank Data Online,

senyawa yang tergolong ke dalam golongan alkaloid, flavonoid, saponin, dan triterpenoid (Tabel 2). Senyawa yang paling banyak adalah alkaloid, sedangkan saponin merupakan senyawa yang paling sedikit.

sehingga tidak tersedia struktur 2D atau 3D untuk dilakukan penambatan molekuler.

Tabel 1. Senyawa pada ekstrak krokot yang teridentifikasi dengan LCMS/MS QTOF

No.	Kode CID	Senyawa	Golongan
1.	24832659	<i>Benzoylmesaconine</i>	Alkaloid
2.	15558956	<i>Dihydrogentianine</i>	
3.	-	<i>Isodidehydrotuberostemonine</i>	
4.	-	<i>Isepteropodic acid</i>	
5.	-	<i>N-cis-Feruloyl tyramine</i>	
6.	21574472	<i>Oleracein A</i>	Flavonoid
7.	21574474	<i>Oleracein C</i>	
8.	21574475	<i>Oleracein D</i>	
9.	64959	<i>Xanthosine</i>	
10.	5322061	2, 5, 7-Trihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl) chroman-4-one	
11.	5317700	<i>Aleosone</i>	Saponin
12.	46887678	<i>Ginsenoside F3</i>	
13.	14109375	<i>Lucidenic acid A</i>	
14.	91439	<i>Smilagenin</i>	

Dalam penelitian ini, digunakan 11 ligan uji yang berasal dari senyawa pada batang krokot (Tabel 2). Sebagai ligan pembanding, digunakan beta amyrin. Ligan uji dan pembanding diunduh dalam bentuk 3D dengan format .sdf dari laman PubChem. Setelah itu, ligan-ligan tersebut dipreparasi dengan menambahkan ion hidrogen dan dilakukan optimasi geometri menggunakan perangkat lunak *YASARA Structure*. Untuk mencari posisi dengan energi terendah, proses minimisasi energi diulang sebanyak tiga kali sampai tercapai energi minimum keseluruhan.

Hasil identifikasi bioavailabilitas menunjukkan bahwa terdapat empat ligan yang memiliki massa molekul lebih besar dari 500 Da, yaitu Ginsenoside F3, Oleracein A, Oleracein C, dan Oleracein D (Tabel 3).

Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen merupakan descriptor molekuler mendasar

untuk memprediksi bioavailabilitas kandidat obat kecil. Donor dan akseptor ikatan hidrogen mempengaruhi difusi pasif dalam melewati membran sel.

Jumlah donor/akseptor yang terlalu banyak dapat merusak partisi dan permeabilitas membran obat serta menunjukkan tingkat energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi [8]. Terdapat beberapa ligan pada penelitian ini yang memiliki donor ikatan hidrogen lebih dari 5 dan akseptor ikatan hidrogen lebih dari 10, antara lain *Benzoylmesaconine*, *Ginsenoside F3*, *Oleracein A*, *Oleracein C*, *Oleracein D*, dan *Xanthosine* (Tabel 2).

Log P adalah bagian dari aturan 5 Lipinski yang digunakan untuk memperkirakan kemampuan larut dan permeabilitas obat. Log P adalah ukuran lipofilisitas yang paling umum digunakan. Log P menggambarkan koefisien

partisi molekul antara fase air dan lipofilik, seperti oktanol dan air. Sifat lipofilik obat memengaruhi proses farmakokinetik pada organisme hidup, terutama dalam proses distribusi. Semua senyawa yang memasuki sel-sel tubuh mengalami hambatan lipofilik atau selaput sel. Hanya molekul dengan afinitas yang sesuai dengan membran biologis lipofilik yang dapat melewatinya.

Hal ini mempengaruhi distribusi obat dalam tubuh manusia dan membantu zat tersebut mencapai reseptor [9]. Semua ligan yang diteliti dalam penelitian ini memiliki nilai Log P yang sesuai dengan aturan Lipinski, yaitu tidak lebih besar dari 5 (Tabel 2). Nilai Log P positif menunjukkan preferensi untuk lingkungan lipofilik atau hidrofobik, sedangkan nilai negatif menunjukkan preferensi untuk lingkungan lipofilik atau hidrofilik [9,10].

Aturan Lipinski terakhir adalah refraktivitas molar, yang harus berada dalam kisaran 40-130 menurut aturan Lipinski [7]. Refraktivitas molar tidak hanya bergantung pada volume molekul tetapi juga pada gaya dispersi London yang terlibat dalam interaksi obat-reseptor [11]. Beberapa ligan dalam penelitian ini tidak memenuhi kisaran refraktivitas molar yang ditetapkan oleh aturan Lipinski, yaitu *Ginsenoside F3*, *Oleracein C*, dan *Oleracein D* (Tabel 2). Ligan-ligan ini cenderung memiliki penyerapan obat yang buruk. Menurut [7], ligan yang memenuhi 3-5 aturan Lipinski dapat dijadikan sebagai target pengembangan obat. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa dari keseluruhan ligan yang diuji, 7 ligan sesuai dengan aturan Lipinski dan 5 ligan lainnya tidak memenuhi aturan Lipinski (Tabel 2). Kelima ligan yang tidak memenuhi aturan Lipinski adalah *Benzoylmesaconine*, *Oleracein A*, *Oleracein C*, *Oleracein D*, dan *Ginsenoside F3*. Sementara itu, ligan-ligan yang memenuhi aturan Lipinski adalah *Beta amyryin*, *Dihydrogentianine*, *Xanthosine*, *2,5,7-Trihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl) chroman-4-one*, *Aloesone*, *Lucidenic acid A*, dan *Smilagenin*.

Prediksi toksisitas menunjukkan bahwa terdapat 5 ligan uji yang berbahaya dan 2 ligan uji yang aman bagi tubuh (Tabel 3). Ligan yang dianggap toksik adalah *Beta amyryin*, *2,5,7-Trihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl) chroman-4-one*, *Aloesone*, *Lucidenic acid A*, dan *Smilagenine*. Sedangkan *Dehydrogentianine* dan *Xanthosine* dianggap aman karena lolos prediksi toksisitas.

Hepatotoksitas terjadi ketika zat kimia berbahaya merusak sel-sel hati [12]. Karsinogenitas terjadi ketika senyawa kimia dapat menyebabkan pertumbuhan sel kanker dalam tubuh [13]. Imunotoksitas terjadi ketika sistem kekebalan tubuh rusak karena paparan zat kimia. Mutagenisitas terjadi ketika senyawa kimia menyebabkan kerusakan DNA dan sitotoksitas merujuk pada kemampuan senyawa untuk menyebabkan kerusakan sel (prediksi).

Validasi gridbox dilakukan menggunakan software YASARA structure. Reseptor superoksida dismutase (SOD) dengan kode PDB ID 1CB4 tidak memiliki ligan alami yang melekat pada strukturnya. Validasi gridbox dilakukan dengan membuat kotak-kotak grid di sekitar residu sisi pengikatan ligan pada reseptor. Gridbox dibuat dengan jangkauan 0,5 – 5,0Å dengan selisih 0,5Å. Hasil validasi menunjukkan bahwa kotak grid terbaik memiliki ukuran 3,0Å dengan nilai x, y, z sebesar 15,64Å.

Penambatan molekuler dilakukan menggunakan software YASARA structure. Tahap awal dalam penambatan molekuler adalah persiapan reseptor dan ligan yang akan diuji. Persiapan reseptor meliputi penghapusan molekul air (H_2O_2) dan penambahan ion hidrogen. Sementara itu, persiapan ligan yang akan diuji melibatkan penambahan ion hidrogen dan minimisasi energi. Penghapusan molekul air (H_2O_2) dilakukan untuk menghilangkan unsur air dari reseptor sehingga pada proses docking hanya asam amino yang berinteraksi dengan senyawa uji. Penambahan ion hidrogen penting dilakukan karena interaksi yang terjadi pada umumnya adalah melalui ikatan hidrogen, sehingga diperlukan penambahan ion hidrogen agar proses docking berjalan secara optimal. Minimisasi energi bertujuan untuk menjaga stabilitas ikatan pada ligan uji [14, 15].

Dalam penelitian ini, digunakan reseptor superoksida dismutase (SOD) dengan kode PDB ID 1CB4 dan tiga jenis ligan, yaitu *beta amyryin*, *dihydrogentianine*, dan *xanthosine*. *Beta amyryin* digunakan sebagai ligan pembanding dan berikatan dengan reseptor pada sisi alosterik enzim. Asam amino yang terlibat dalam interaksi antara reseptor dan ligan dapat diketahui dari total interaksi pada *beta amyryin* yang terdiri dari 16 interaksi, yaitu 1 ikatan hidrogen, dan 15 ikatan hidrofobik, yang tersebar pada rantai A dan B. Residu yang berikatan hidrogen adalah Val146(A) (2.48 Å).

Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa beta amyrin memiliki 1 ikatan hidrogen pada residu Val146 di rantai A [30].

Residu yang berikatan secara hidrofobik pada rantai A terdiri dari Val7, Lys9, Asn51, Cys144, dan Gly145, sedangkan pada rantai B terdiri dari

Dalam penambatan molekuler, ligan uji yang digunakan terdiri dari *dihydrogentianine* dan *xanthosine*. *Dihydrogentianine* berikatan dengan reseptor pada sisi alosterik dan memiliki rantai A terdiri dari Cys6, Val7, Lys9, dan Gly145 sedangkan pada rantai B terdiri dari Val7, Lys9, Asn51, Gly54, Cys144, dan Gly145. *Xanthosine* berikatan dengan reseptor pada sisi aktif (Asp11 (B)) dan sisi alosterik serta memiliki 13 interaksi yang tersebar pada rantai A dan B. Tiga ikatan hidrogen terbentuk pada Lys9 (2.87 Å) pada rantai A, serta Val7 (2.34 Å) dan Val146 (2.53 Å) pada rantai B. Residu yang berikatan secara hidrofobik pada rantai A terdiri dari Val7, Asn51, Gly145, dan Val146, sedangkan pada rantai B terdiri dari Cys6, Asp11, Asn51, Gly54, Cys144, dan Gly145.

Xanthosine merupakan ligan yang dapat menjadi aktivator superoksida dismutase. Hal tersebut dikarenakan *xanthosine* tertambat pada residu Asp11 di rantai B. Residu aspartat (Asp) dapat berperan sebagai katalis dalam reaksi enzimatik pada enzim superoksida dismutase (SOD). SOD adalah kelompok enzim yang mengkatalisis penguraian superoksida ($O_2^{\cdot -}$) menjadi oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2).

Salah satu contoh enzim SOD yang melibatkan residu Asp dalam katalisis adalah SOD mangan (Mn-SOD). Pada SOD mangan, residu Asp yang kritis berinteraksi dengan ion mangan (Mn^{2+}) dan berperan dalam transfer elektron selama reaksi katalitik. Residu Asp ini membantu dalam koordinasi ion mangan dan berkontribusi pada kemampuan enzim untuk mengkatalisis penguraian superoksida.

Ikatan hidrogen adalah hasil dari interaksi antara molekul polar yang memiliki atom H dengan atom N, O atau F. Menurut [16,17], semakin banyak asam amino yang terlibat dalam ikatan hidrogen maka semakin kuat dan stabil ikatan tersebut. Ligan uji yang memiliki jumlah ikatan hidrogen terbanyak adalah *xanthosine*. Dalam hal ini, *xanthosine* memiliki 3 ikatan hidrogen, sedangkan *beta amyrin* dan *dihydrogentianine* masing-masing hanya memiliki 1 dan 2 ikatan hidrogen. Oleh karena itu, *xanthosine* dianggap sebagai ligan uji

Val7, Lys9, Gly10, Asp11, Asn51, Gly54, Cys55, Cys144, Gly145, dan Val146.

Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa residu yang berinteraksi antara beta amyrin dengan enzim SOD adalah Val7, Lys9, Gly10, Asp11, Asn51, Gly54, Cys144, Gly145, dan Val146 [15].

12 interaksi yang tersebar pada rantai A dan B. Dua ikatan hidrogen terbentuk pada Val146 pada rantai A (2.39 Å) dan B (2.38 Å). Sementara itu, residu yang berikatan secara hidrofobik pada dengan ikatan yang paling kuat dan stabil dibandingkan dengan ligan uji lainnya. Jarak ikatan hidrogen pada semua ligan uji berada dalam kisaran 2,34 - 3,55 Å. Menurut [18], jarak ikatan hidrogen lebih dari 1,85 Å dianggap lemah dan dapat diputus untuk membentuk ikatan lain. Ikatan hidrofobik juga penting dalam menstabilkan ligan terhadap reseptor [19]. Pembentukan ikatan hidrofobik berfungsi untuk meminimalkan interaksi antara residu nonpolar dengan air. Residu yang terlibat dalam pembentukan ikatan hidrofobik biasanya berupa asam amino yang bersifat nonpolar [20].

Data hasil penambatan molekuler selanjutnya meliputi nilai energi bebas Gibbs (ΔG) dan konstanta disosiasi (kd). ΔG adalah parameter termodinamika yang menggambarkan kespontanan suatu reaksi kimia. Nilai ΔG yang lebih kecil menandakan semakin stabilnya konformasi. Semakin kecil nilai ΔG , semakin stabil dan kuat interaksi antara ligan dan reseptor, dan sebaliknya jika nilai ΔG lebih besar [21].

Nilai ΔG dari semua ligan dalam penambatan molekuler ini berkonotasi negatif. *Beta amyrin* merupakan ligan dengan ΔG yang paling kecil diantara ligan lainnya, yaitu sebesar -8.24 kkal/mol. Nilai ΔG dari terkecil ke terbesar selanjutnya setelah *beta amyrin* adalah *xanthosine* dan *dihydrogentianine*. Selain nilai ΔG , terdapat juga nilai konstanta disosiasi (Kd). Konstanta disosiasi (Kd) disebut juga konstanta inhibisi (Ki), yaitu konstanta kesetimbangan dari suatu enzim dengan inhibitorynya [19,20]. Nilai Kd berbanding lurus dengan nilai ΔG . Nilai Kd yang semakin kecil menunjukkan afinitas ikatan ligan dan reseptor semakin besar. *Beta amyrin* sebagai ligan uji memiliki nilai Kd terkecil, yaitu sebesar 0.90 μM . Ligan uji dengan nilai Kd terkecil ke terbesar selanjutnya setelah *beta amyrin* secara berturut-turut adalah *xanthosine* dan *dihydrogentianine*. *Xanthosine* sebesar 7.37 μM dan *dihydrogentianine* sebesar 29.46 μM [16].

Tabel 2. Bioavailabilitas ligan

No	Kode CID	Senyawa	Bobot molekul (Da)	Donor ikatan hidrogen	Akseptor ikatan hidrogen	Log P	Refraktivitas Molar
1.	73145	<i>Beta amylin</i>	426	1	1	1,40	108,20
2.	24832659	<i>Benzoylmesaconine</i>	590	5	10	-0,41	128,79
3.	15558956	<i>Dihydrogentianine</i>	177	0	3	0,71	42,51
4.	21574472	<i>Oleracein A</i>	503	7	12	-0,88	119,65
5.	21574474	<i>Oleracein C</i>	665	10	17	-3,36	150,76
6.	21574475	<i>Oleracein D</i>	695	10	18	-2,87	154,53
7.	64959	<i>Xanthosine</i>	284	5	9	-2,19	60,10
8.	5322061	2, 5, 7-Trihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl) chroman-4-one	344	3	6	2,29	83,53
9.	5317700	<i>Aleosone</i>	232	1	4	1,22	56,51
10.	46887678	<i>Ginsenoside F3</i>	770	9	13	-4,82	170,68
11.	14109375	<i>Lucidenic acid A</i>	458	2	6	-0,62	107,34
12.	91439	<i>Smilagenin</i>	416	1	3	0,71	101,04

Keterangan: **Kuning** : tidak memenuhi aturan *Lipinski*, **Merah** : ligan melanggar >2 aturan *Lipinski*

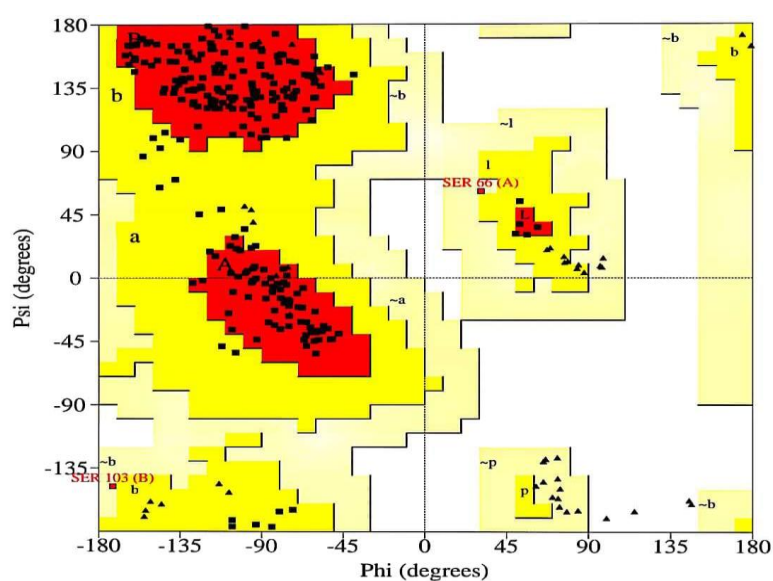
Tabel 3. Toksisitas ligan

N o	Kode CID	Senyawa	Kateg ori toksisitas	Hepatotoksitas	Karsinogenitas	Imunotoksitas	Mutagenitas	Sitotoksitas
1.	73145	<i>Beta amylin</i>	6	Inaktif	Inaktif	Aktif	Inaktif	Inaktif
2.	15558956	<i>Dihydrogentianine</i>	6	Inaktif	Inaktif	Inaktif	Inaktif	Inaktif
3.	64959	<i>Xanthosine</i>	6	Inaktif	Inaktif	Inaktif	Inaktif	Inaktif
4.	5322061	2, 5, 7-Trihydroxy-6,8-dimethyl-3-(4'-methoxybenzyl) chroman-4-one	4	Inaktif	Inaktif	Aktif	Aktif	Inaktif
5.	5317700	<i>Aleosone</i>	5	Inaktif	Inaktif	Inaktif	Aktif	Inaktif
6.	14109375	<i>Lucidenic acid A</i>	6	Inaktif	Aktif	Inaktif	Inaktif	Aktif
7.	91439	<i>Smilagenin</i>	3	Inaktif	Inaktif	Aktif	Inaktif	Inaktif

Keterangan: **Merah** : ligan bersifat toksik

Tabel 4. Penambatan molekuler

No	Kode CID	Senyawa	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik	Energi ikatan (kcal/mol)	Kd (μ M)
1.	73145	<i>Beta amyrin</i>	Rantai A: Val146 (2,48 Å)	Rantai A: Val7, Val9, Asn51, Cys144, Gly145 Rantai B: Val7, Val9, Gy10, Asn51, Gly54, Cys55, Cys144, Gly145, Val146	-8,25	0,90
2.	15558956	<i>Dihydrogentianine</i>	Rantai A: Val146 (2,39 Å) Rantai B: Val146 (2,38 Å)	Rantai A: Val7, Val9, Rantai A: Val7, Val9, Gly145 Rantai B: Val7, Val9, Asn51, Gly54, Cys144, Gly145	-6,18	29,46
3.	64959	<i>Xanthosine</i>	Rantai A: Lys9 (2,87 Å) Rantai B: Val 7 (2,34 Å) Val146 (2,53 Å)	Rantai A: Val7, Asn51, Gly145, Val146 Rantai B: Cys6, Asp11, Asn51, Gly54, Cys144, Gly145	-7,00	7,37



Gambar 1. Plot Ramachandran

SIMPULAN

Berdasarkan LC/MS, telah diidentifikasi 14 senyawa pada batang krokot. Sebelas senyawa di antaranya dapat ditemukan pada database PubChem. Dengan menggunakan <http://www.scfbio-itt.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>, 7 senyawa yang stabil telah diidentifikasi melalui identifikasi bioavailabilitas.

Dua di antaranya dinyatakan aman berdasarkan prediksi toksisitas ligan

menggunakan ProTox II webserver. Dalam penambatan molekuler dengan perangkat lunak YASARA structure, senyawa *xanthosine* menunjukkan potensi sebagai aktivator enzim SOD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Riyan Alifbi Putera Irsal yang telah berperan dalam penulisan jurnal.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Uddin MK, Juraimi AS, Ali ME, Ismail MR. 2012. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(8): 10257–10267.
- [2] Husnawati, Purwanto UMS, Rispriandari AA. 2020. Perbedaan bagian tanaman krokot (*Portulaca grandiflora* Hook.) terhadap kandungan total fenolik dan flavonoid serta aktivitas antioksidan. *Current Biochemistry*. 7(1): 10-20.
- [3] Yang X, Zhang W, Ying X, Stien D. 2018. New flavonoids from *Portulaca oleracea* L. and their activities. *Fitoterapia*. 127: 257-262.
- [4] Gallo M, Conte E, Naviglio D. 2017. Analysis and comparison of the antioxidant component of *Portulaca oleracea* leaves obtained by different solid-liquid extraction techniques. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 6(3): 64.
- [5] Younus H. 2018. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*. 12(3): 88–93.
- [6] Ighodaro OM, Akinloye OA. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 54(4): 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- [7] Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea, TI. 2016. BDDCS, the rule of 5 and drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 101: 89–98 .
- [8] Coimbra JTS, Feghali R, Ribeiro RP, Ramos MJ, Fernandes PA. 2021. The importance of intramolecular hydrogen bonds on the translocation of the small drug piracetam through a lipid bilayer. *RSC Adv*. 11: 899-908. <https://doi.org/10.1039/D0RA09995C>.
- [9] Irsal RAP, Seno DSH, Safithri M, Kurniasih R. 2022. Penapisan virtual senyawa aktif sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai inhibitor angiotensin converting enzyme. *Jurnal Farmamedika*. 7(2): 1-9.
- [10] Irsal RAP. 2022. Penambatan molekuler senyawa aktif sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai inhibitor angiotensin converting enzyme [Skripsi]. Bogor (ID): IPB University.
- [11] Padron JA, Carrasco R, Pellon RF. 2002. Molecular descripto based on a molar refractivity partition using Randic-type graph-theoretical invariant. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 5(3): 258-266.
- [12] Gadaleta D, Vukovic K, Toma C, Lavado GJ, Karmaus AL, Mansouri K, Kleinstreuer NC, Benfenati E, Roncaglioni A. 2019. SAR and QSAR modeling of a large collection of LD₅₀ rat acute oral toxicity data. *J Cheminformatics*. 11(56): 1-16.

- [13] Juliarta IG, Mulyantari NK, Yasa IWPS. 2018. Gambaran hepatotoksisitas (ALT/AST) penggunaan obat anti tuberculosis lini pertama dalam pengobatan pasien tuberculosis paru rawat inap di RSUP Sanglah Denpasar tahun 2014. *E-Jurnal Medika*. 10(7): 1-10.
- [14] Kananga AF. 2020. Penapisan virtual senyawa aktif ginseng (*Panax ginseng*) terhadap PPAR γ dalam meningkatkan sensitivitas insulin [Skripsi]. Bogor (ID): IPB University.
- [15] Huda AS. 2021. Identifikasi senyawa aktif teh hitam dan kunyit dalam meningkatkan aktivitas enzim superoksida dismutase secara *in silico* [Skripsi]. Bogor(ID): IPB University.
- [16] Suhadi A, Rizarullah, Feriyani. 2019. Simulasi docking senyawa aktif daun binahong sebagai inhibitor enzim aldose reduktase. *Sel J Penelit Kesehat*. 6(2): 55–65. doi:10.22435/sel.v6i2.1651.
- [17] Hasan AE, Safithri M, Huda AS, Kurniasih R. 2022. In silico, to determine the active compounds of black tea and turmeric in increasing the activity of the enzyme SOD. *Indonesian Journal of Applied Research*. 3(1): 32-45.
- [18] Zahra H, Ambarsari L, Setyawati I, Gholam GM, Wahyudi ST. 2023. Molecular dynamic study of *B. subtilis* laccase against POME waste components with temperature variations and adjustment of active site mutations. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 13(6).
- [19] Gholam GM, Artika IM. 2023. Potensi terbentuk interaksi molekuler pada fitokimia alami sebagai inhibitor Sap 2 *Candida albicans*: pendekatan in silico. *Jurnal Farmasi Udayana*. 11(2).
- [20] Tallei TE, Tumilaar SG, Niode NJ, Fatimawali, Kepel BJ, Idroes R, Effendi Y, Sakib SA, Emran TB. 2020. Potential of plant bioactive compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (M^{Pro}) and spike (s) glycoprotein inhibitors: a molecular docking study. *Scientifica*. 2020: 6307457. doi: 10.1155/2020/6307457.
- [21] Patil R, Das S, Stanley A, Yadav L, Sudhakar A, Varma AK. 2010. Optimized hydrophobic interaction and hydrogens bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PLOS One*. 5(8): 1-10