



Identifikasi Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Senyawa Turunan Flavonoid pada Kulit Buah Cokelat (*Theobroma cacao* L.) secara *In Silico*

Sani Ega Priani*, Taufik Muhammad Fakh

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranga Gading No. 8, Bandung 40116 telp. (022) 4203368

*Corresponding author: egapriani@gmail.com

DOI: 10.20961/alchemy.17.2.45317.168-176

Received 30 October 2020, Accepted 15 March 2021, Published 09 September 2021

Kata kunci:

enzim tirosinase;
flavonoid;
kulit buah cokelat;
pola
penghambatan;
studi *in silico*.

ABSTRAK. Limbah kulit buah cokelat diketahui mengandung berbagai senyawa aktif, termasuk di antaranya adalah golongan flavonoid. Senyawa flavonoid diketahui berpotensi memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase, suatu enzim yang menstimulasi proses pembentukan melanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi interaksi antara senyawa flavonoid dari kulit buah cokelat dengan enzim tirosinase menggunakan metode penambatan molekuler secara *in silico*. Pengujian dilakukan dengan beberapa tahapan yakni preparasi makromolekul enzim, pemodelan molekul senyawa uji, identifikasi sisi aktif molekul enzim, identifikasi dan evaluasi penambatan molekuler, serta simulasi dinamika molekuler senyawa uji dengan molekul enzim. Hasil simulasi penambatan molekuler antara molekul enzim dengan ligan alaminya yakni tirosin memberikan energi ikatan sebesar -4,91 kkal/mol. Senyawa flavonoid dari kulit buah cokelat yakni apigenin, epikatekin, katekin, kaempferol, kuersetin, dan kuersitrin diketahui memiliki afinitas pada sisi aktif enzim tirosinase dengan energi ikatan berturut turut -6,14; -6,17; -6,01; -5,89; -6,13; -6,81 kkal/mol. Hasil simulasi dinamika molekuler menunjukkan kuersitrin memiliki stabilitas yang baik dengan nilai RMSD rata-rata dan nilai energi bebas ikatan MM/PBSA masing-masing sebesar $\pm 1,73$ Å dan -80,12 kJ/mol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa turunan flavonoid tersebut mampu berikatan dengan sisi aktif enzim tirosinase dengan afinitas yang lebih baik dibandingkan dengan ligan alaminya diamati dari nilai energi ikatannya. Senyawa turunan flavonoid yang terkandung dalam kulit buah cokelat berpotensi menjadi inhibitor kompetitif dari enzim tirosinase.

Keywords:

tyrosinase enzyme;
flavonoid;
cocoa pod husk;
inhibitory pattern;
in silico study.

ABSTRACT. Identification of *In Silico* Tyrosinase Inhibitory Activity of Flavonoid Derivative Compounds in Cocoa Pod Husk (*Theobroma cacao* L.). Cocoa pod husk was known to contain several active compounds, such as flavonoids. Flavonoid compounds are known to potentially have inhibitory activity of the tyrosinase, the enzyme which stimulates melanin synthesis. This study was conducted to evaluate the molecular interaction between flavonoids from cocoa pod husk with tyrosinase enzyme using *in silico* molecular docking method. The study was carried out through several stages, including preparation of enzyme macromolecules, modeling the molecule of the test compound, identifying the active site of the enzyme molecule, identifying and evaluating molecular docking, and molecular dynamics simulations of the test compound with the enzyme molecule. Molecular docking simulation between the enzyme and its natural ligand (tyrosine) produces binding energy of -4.91 kcal/mol. Flavonoid compounds from cocoa pod husk, including apigenin, epicatechin, catechin, kaempferol, quercetin, dan quercitrin, have an affinity on the active site of the enzyme with binding energy were -6.14; -6.17; -6.01; -5.89; -6.13; -6.81 kcal/mol, respectively. Then the molecular dynamics simulation shows quercitrin has good stability interaction with the average RMSD value and the MM/PBSA binding-free energy values of ± 1.73 Å and -80.12 kJ/mol, respectively. The results showed that flavonoids of cocoa pod husk extract have an affinity to the active site of the enzyme, with a stronger binding energy than the original ligand. The flavonoid compounds of cocoa pod husk potential as a competitive inhibitor of the tyrosinase enzyme.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara terbanyak ketiga yang memproduksi buah kakao atau cokelat. Tingginya produksi buah cokelat di Indonesia, menyebabkan tingginya juga produksi limbah sisa pengolahan yakni berupa kulit buahnya. Komponen kulit buah cokelat bisa mencapai 75% dari total buah. Limbah kulit buah cokelat ini belum banyak dimanfaatkan di masyarakat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kulit buah cokelat mengandung berbagai senyawa aktif yang bermanfaat untuk kesehatan termasuk kesehatan kulit (Campos-Vega *et al.*, 2018).

Kulit buah cokelat diketahui mengandung senyawa polifenol dan flavonoid dengan kadar berturut turut $56,5 \pm 0,57$ mg GAE/g dan $22,42 \pm 0,98$ mg rutin equivalent per gram sample (Abdul Karim *et al.*, 2014). Penelitian kami sebelumnya menggunakan kulit buah cokelat dari Ciamis, Jawa Barat menunjukkan kadar polifenol yang lebih tinggi yakni $155,6$ mg GAE/g (Priani *et al.*, 2019). Tingginya kadar polifenol dan flavonoid dari kulit buah cokelat membuatnya berpotensi dimanfaatkan untuk obat ataupun kosmetika. Salah satu jenis kosmetika yang banyak digunakan adalah sediaan pemutih wajah untuk mengatasi hiperpigmentasi.

Hiperpigmentasi adalah kondisi penggelapan warna kulit akibat produksi pigmen kulit/melanin yang berlebihan (Nieuweboer-Krobotova, 2013). Penanganan yang paling umum dilakukan untuk mengatasi kondisi hiperpigmentasi adalah dengan penggunaan senyawa aktif yang memiliki kemampuan menghambat kerja enzim tyrosinase. Enzim tyrosinase adalah enzim yang menstimulasi pembentukan melanin dengan mengkatalisis hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi DOPA kuinon (Nesterov *et al.*, 2008; Zolghadri *et al.*, 2019).

Senyawa polifenol termasuk di dalamnya adalah senyawa flavonoid diketahui memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase secara kompetitif (Nguyen *et al.*, 2016). Senyawa tersebut mampu berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga berkompetisi dengan substrat alaminya yakni tirosin. Enzim tirosinase adalah metaloenzim yang mengandung ion tembaga (Cu) dan senyawa flavonoid diketahui dapat menjadi *copper chelator* juga mendukung aktivitas inhibisi ini (Gao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian sudah berhasil menemukan kandungan senyawa aktif dalam ekstrak kulit buah coklat, termasuk kandungan senyawa flavonoidnya. Diketahui senyawa flavonoid dalam kulit buah cokelat diantaranya adalah apigenin, epikatekin, katekin, kaemferol, kuersetin, dan kuersitrin (Abdul Karim *et al.*, 2014; Irondi *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2006; Md Yusof *et al.*, 2019). Senyawa turunan flavonoid tersebut selanjutnya diuji secara *in silico* untuk memprediksi adanya aktivitas inhibitor tirosinase dari senyawa tersebut dengan metode penambatan molekuler (*molecular docking*). Metode ini dapat digunakan untuk memprediksi orientasi ikatan suatu ligan dengan reseptor dalam suatu kompleks molekul yang stabil dan juga bisa mengkalkulasi besarnya energi ikatan yang terjadi (Asadzadeh *et al.*, 2015).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat dan mengukur interaksi antara senyawa turunan flavonoid dengan sisi aktif enzim tirosinase yang dilakukan secara *in silico*, dimana kemampuan senyawa untuk berikatan dengan sisi aktif enzim, membuatnya berpotensi memiliki aktivitas inhibitor tirosinase. Parameter interaksi yang diamati meliputi besarnya energi ikatan juga residu asam amino yang terlibat dalam interaksi molekuler. Selain itu, pengujian juga dilakukan untuk melihat stabilitas interaksi yang terjadi dengan metode dinamika molekuler.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur kristal makromolekul enzim tirosinase yang mampu membentuk kompleks dengan ligan alaminya yaitu tirosin. Makromolekul enzim tersebut diperoleh dari web Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) dengan kode PDB 6JU9 dan memiliki resolusi $1,42 \text{ \AA}$ (Gambar 1) (Fujieda *et al.*, 2020). Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini diantaranya terdapat Sistem Operasi Windows 10, MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2, Gromacs 2016.3, AnteChamber Python Parser interface (ACYPPE), MMPBSA.py, VMD 1.9.3, dan BIOVIA Discovery Studio 2020. Perangkat keras yang digunakan adalah komputer dengan spesifikasi processor Intel (R) Core i3-6100 CPU @ 2.30GHz (4 CPUs), memory 4096 MB RAM, Harddisk 320GB, dan VGA Intel HD Graphics 520.

Preparasi Makromolekul Enzim

Struktur kristal makromolekul enzim tirosinase yang telah diunduh dari web Protein Data Bank 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 (Fakhri *et al.*, 2020).

Preparasi Molekul Senyawa Uji

Senyawa uji yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah katekin, epikatekin, quercetin, quercitrin, kaemferol, dan apigenin. 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 (Gaillard, 2018).

Identifikasi Sisi Aktif Makromolekul Enzim

Makromolekul enzim yang telah dipreparasi kemudian diidentifikasi, dievaluasi, dan dieksplorasi bagian sisi aktif pengikatan yang berperan terhadap aktivitas biologis 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 (Fakhri and Dewi, 2020).

Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan proses pemisahan reseptor target dengan ligan alami (*re-docking*), kemudian dilakukan simulasi penambatan molekuler kembali. Keberhasilan dari proses *re-docking* ini dapat dilakukan dengan mengamati nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Nilai RMSD merupakan parameter yang menunjukkan seberapa besar perubahan interaksi pada struktur kristal sebelum dan sesudah proses *re-docking*. Suatu parameter dikatakan memenuhi persyaratan validasi metode apabila hasil proses *re-docking* memiliki nilai RMSD kurang dari 2 Å (Hevener *et al.*, 2009).

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 molekul katekin, epikatekin, quercetin, quercitrin, kaempferol, dan apigenin. 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 64×60×60, selanjutnya digunakan metode Lamarckian Genetic Algorithm dengan 100 konformasi (Senol *et al.*, 2014).

Analisis Hasil Simulasi Penambatan Molekuler

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 (Ramadhan *et al.*, 2020).

Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler dilakukan terhadap senyawa terbaik hasil penambatan molekuler, yaitu quercitrin beserta tirosin sebagai ligan alami dengan menggunakan perangkat lunak Gromacs 2016.3. Topologi dan parameterisasi senyawa dibuat dengan menggunakan perangkat lunak AnteChamber Python Parser interface (ACPPYE). Simulasi dinamika molekuler dilakukan hingga kompleks telah mencapai keadaan stabil (berdasarkan analisis energi, tekanan, temperatur, dan *Root Mean Square Deviation* (RMSD)). Hasil simulasi kemudian dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak VMD 1.9.3 (Dahmani *et al.*, 2021).

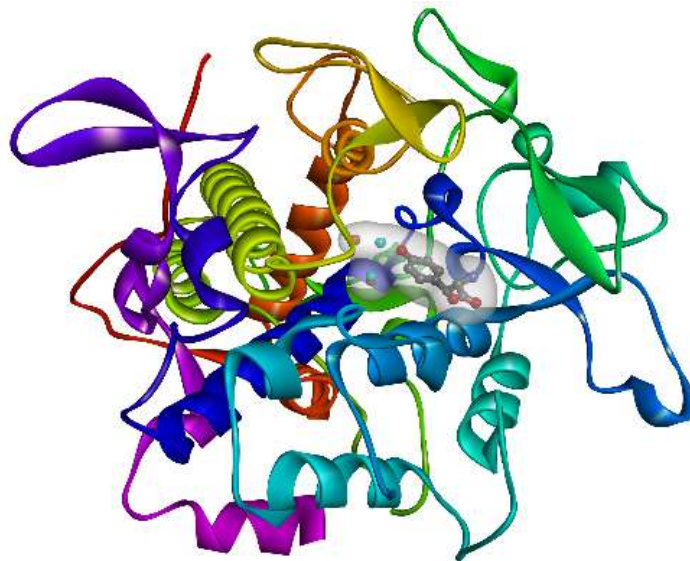
Perhitungan MM/PBSA

Perhitungan energi bebas dengan metode *molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area* (MM/PBSA) dilakukan menggunakan *g_mmpbsa* package yang telah terintegrasi dengan perangkat lunak Gromacs 2016.3. Metode perhitungan ini dilakukan terhadap output hasil simulasi dinamika molekuler kompleks saat interaksi kompleks telah mencapai stabilitas yang konstan (Al-Khafaji and Taskin Tok, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enzim tirosinase adalah suatu metaloenzim yang mengandung ion Cu, yang mengkatalisis sintesis melanin dengan menghidrosilasi tirosin menjadi L-DOPA dan selanjutnya mengoksidasi L-DOPA menjadi DOPA-kuinon pada rangkaian tahapan proses sintesis melanin. Dari proses tersebut diketahui bahwa ligan alami dari enzim tirosinase adalah senyawa tirosin, suatu asam amino non-esensial di dalam tubuh. Hambatan pada pembentukan ataupun aktivitas enzim ini akan menyebabkan pigmen melanin berkurang dan dapat mengurangi kondisi hiperpigmentasi kulit (Chang, 2009).

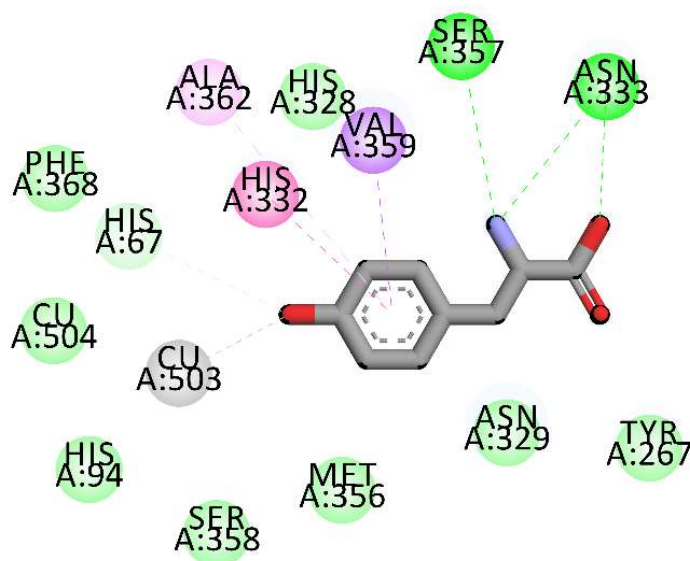
Salah satu metode untuk memprediksi aktivitas inhibitor tirosinase adalah dengan melakukan metode *molecular docking* atau penambatan molekuler. Teknik ini mampu memprediksi terjadinya suatu ikatan antara ligan dengan reseptor untuk dapat membentuk suatu kompleks ligan reseptor yang stabil. Metode ini memprediksi kekuatan atau energi ikatan yang terjadi sehingga dapat menggambarkan afinitas ligan dan reseptor. Dalam hal penelitian ini yang menjadi reseptor adalah sisi aktif dari enzim tirosinase sedangkan yang menjadi ligan adalah tirosin sebagai ligan alami dan senyawa flavonoid dari kulit buah coklat sebagai senyawa uji (Senol *et al.*, 2014).



Gambar 1. Struktur makromolekul enzim tirosinase dalam bentuk kompleks dengan tirosin.

Makromolekul enzim tirosinase yang mampu membentuk kompleks dengan tirosin diperoleh dari Protein Data Bank, dan dapat dilihat pada Gambar 1. Selanjutnya, analisis dan validasi metode penambatan molekuler dilakukan untuk penetapan sisi aktif dari enzim tirosinase berdasarkan interaksinya dengan ligan alaminya yaitu tirosin. Berdasarkan hasil validasi metode diperoleh nilai RMSD sebesar 0,60 Å. Dengan demikian, parameter hasil validasi dapat digunakan dalam tahapan simulasi penambatan molekuler yang berupa ukuran gridbox $44 \times 40 \times 40$ dan gridcenter $-16,011 \times -22,493 \times 14,826$. Kemudian, visualisasi interaksi yang terjadi digambarkan pada Gambar 2. Hasil menunjukkan bahwa tirosin berikatan enzim tirosinase dengan area sisi aktif yakni His67, Asn333, Ser357, His332, Val 359, Cu503. Besarnya energi ikatan yang terbentuk antara tirosin dengan sisi aktif enzim tirosinase adalah -4,91 kkal/mol.

Setelah itu, studi penambatan molekuler dilakukan terhadap enam senyawa flavonoid yang diketahui terkandung dalam kulit buah coklat. Senyawa uji yang digunakan adalah katekin, epikatekin, quercetin, quercitrin, kaempferol, dan apigenin. Struktur molekul senyawa diperoleh dari web Pubchem. Hasil uji menunjukkan bahwa semua senyawa uji mampu berikatan dengan area sisi aktif enzim dengan besar energi ikatan yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 1. Energi ikatan pada proses penambatan molekuler menggambarkan afinitas ikatan senyawa uji terhadap protein target dalam hal ini enzim tirosinase. Nilai energi ikatan yang semakin rendah (semakin negatif) menunjukkan tingkat kekuatan ikatan antara senyawa uji dengan protein target semakin baik, sehingga dapat dikatakan afinitasnya semakin besar (Muhammad and Fatima, 2015).



Gambar 2. Sisi aktif enzim tirosinase dan interaksi molekul yang terbentuk dengan tirosin.

Berdasarkan hasil uji diketahui keenam senyawa uji memiliki nilai energi ikatan yang lebih rendah (lebih negatif). Nilai tersebut menunjukkan bahwa senyawa turunan flavonoid dari kulit buah coklat yakni katekin, epikatekin, quercetin, quercitrin, kaempferol, dan apigenin memiliki afinitas yang lebih baik dibandingkan dengan tirosin terhadap sisi aktif enzim tirosinase dilihat dari nilai energi ikatan yang terbentuk. Senyawa turunan tersebut diprediksi dapat menjadi inhibitor kompetitif dengan enzim tirosinase (Adnyani *et al.*, 2019). Berdasarkan nilai energi ikatannya kuersitrin diketahui memiliki afinitas paling baik dibandingkan dengan lima senyawa flavonoid lainnya terhadap enzim tirosinase. Kuersitrin merupakan senyawa glikosida hasil pembentukan kuersetin dengan gula deoksi ramnosa (Ma *et al.*, 2014).

Aktivitas golongan flavonoid sebagai inhibitor tirosinase sudah cukup banyak dilakukan. Flavonoid memiliki konfigurasi C6 – C3 – C6, yang antar senyawa dibedakan berdasarkan tingkat unsaturasi dan substitusi hidroksilnya. Struktur polihidroksifenik dari flavonoid yang diketahui mampu menyebabkan interaksi dengan sisi aktif enzim tirosinase. Jenis substitusi rantai samping dari flavonoid diketahui dapat berpengaruh terhadap aktivitas inhibisinya. Diketahui bahwa substitusi OH pada atom C3' dan C4' (*3',4'-dihydroxyl*) dapat berpengaruh pada peningkatan aktivitas inhibisinya. Kuersetin, kuersitrin, katekin, dan epikatekin diketahui memiliki substitusi OH pada kedua atom C tersebut. Pengaruh rantai samping lainnya terhadap aktivitas inhibitor tirosinase perlu diteliti lebih lanjut (Şöhretoğlu *et al.*, 2018).

Tabel 1. Nilai energi bebas ikatan hasil simulasi penambatan molekuler.

Nama Senyawa	Nilai Energi Bebas Ikatan (kcal/mol)
Tirosin	-4,91
Apigenin	-6,14
Katekin	-6,01
Epikatekin	-6,17
Kaempferol	-5,89
Kuersetin	-6,13
Kuersitrin	-6,81

Selanjutnya, analisis lanjutan dilakukan untuk mengetahui lebih detail interaksi molekuler yang terbentuk antara keenam senyawa uji dengan enzim tirosinase. Jumlah interaksi yang terjadi dan residu asam amino mana saja yang terlibat dalam interaksi molekuler dengan senyawa uji dapat dilihat pada Tabel 2. Dari hasil tersebut dapat terlihat bahwa semua senyawa uji dapat berinteraksi dengan bagian sisi aktif enzim tirosinase dengan jumlah interaksi berkisar antara 7 – 12 baik dalam bentuk ikatan hidrogen ataupun interaksi hidrofobik.

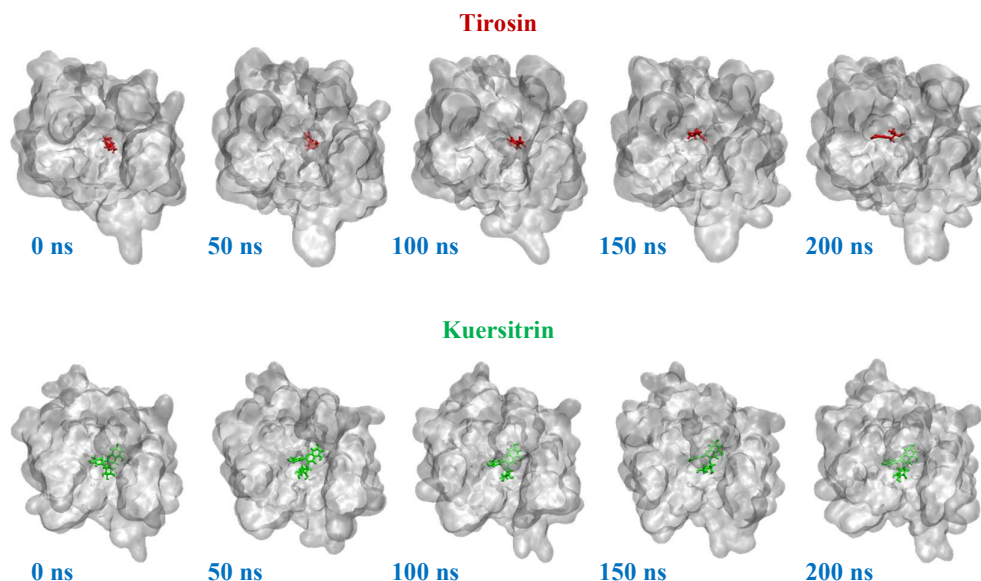
Tabel 2. Interaksi molekuler yang terbentuk hasil simulasi penambatan molekuler.

Nama Senyawa	Jumlah Interaksi	Residu Asam Amino
Tirosin	6	His67, Asn333, Ser357, His332, Val 359, Cu503
Apigenin	10	Asn95, Tyr267, Thr300, Glu307, Asn329, His332, Met356, His94, Val359, Cu503
Epikatekin	7	Thr216, Ser357, Ser358, Val359, Thr216, Val359, Pro360
Kaempferol	9	Asn95, Tyr267, Thr300, Glu307, Asn329, Met356, Thr216, Val359, Pro360
Katekin	12	His67, Tyr267, Glu307, Asn329, Asn333, Met356, Ser357, Tyr267, His332, Val359, Ala362, Cu503
Kuersetin	10	Tyr267, Asn329, Glu307, Asn333, Met356, His94, Tyr267, His332, Val359, Cu503
Kuersitrin	10	Asp83, Thr89, His94, Thr300, Glu325, Asn329, Asn333, His328, Val359, Pro360

Keterangan: Ikatan hidrogen (hijau), interaksi hidrofobik (merah), dan ikatan logam (kuning).

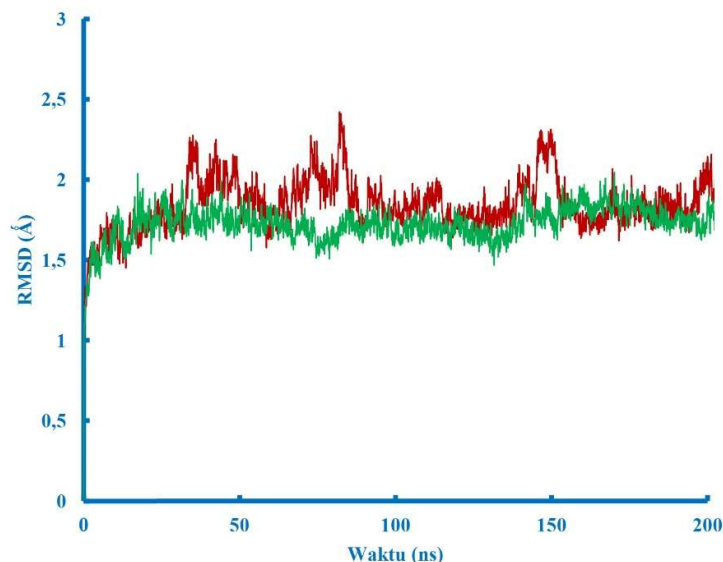
Semakin banyak ikatan hidrogen yang terbentuk maka semakin kuat interaksi yang terjadi antara senyawa uji dengan ligan. Dapat dilihat pada Tabel 2 bahwa jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk pada interaksi antara senyawa turunan flavonoid dengan enzim lebih banyak dibandingkan antara tirosin dengan enzim. Selain ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik terjadi juga interaksi antara senyawa uji dengan atom Cu yang terdapat pada sisi aktif enzim. Diketahui bahwa enzim tirosinase merupakan metaloenzim, kemampuan senyawa flavonoid untuk bereaksi dengan atom Cu, akan mendukung aktivitas inhibisinya. Dari hasil uji diketahui bahwa senyawa flavonoid yang mampu membentuk ikatan dengan Cu seperti ligan alami (tirosin) yakni apigenin, katekin, kuersetin (De *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2003).

Kemudian, untuk memastikan stabilitas interaksi pada sisi aktif enzim tyrosinase maka dilakukan simulasi dinamika molekuler terhadap kuersitrin dan ligan alami (tirosin). Kuersitrin dipilih sebagai perwakilan molekul uji, karena diketahui memiliki afinitas ikatan terbaik dibandingkan dengan senyawa flavonoid lainnya dari kulit buah coklat. Berdasarkan konformasi yang diambil pada setiap 50 ns dapat diamati bahwa tidak terdapat perubahan yang signifikan dari tirosin maupun kuersitrin selama simulasi berlangsung selama 200 ns (Gambar 3). Kedua sistem kompleks tersebut masih tetap stabil pada bagian sisi aktif dari enzim tyrosinase. Akan tetapi, diperlukan pengamatan lebih lanjut menggunakan grafik *Root Mean Square Deviation* (RMSD) sehingga perubahan konformasi dapat teridentifikasi secara keseluruhan.

**Gambar 3.** Konformasi sistem kompleks selama simulasi dinamika molekuler.

Nilai RMSD dari enzim tyrosinase di sekitar sisi aktif dihitung untuk memastikan stabilitas dan rasionalitas dari konformasi. Grafik yang terdapat pada Gambar 4 menunjukkan bahwa tirosin tidak mampu menstabilkan enzim tyrosinase selama simulasi dinamika molekuler. Hal tersebut ditunjukkan dengan fluktuasi pada sistem

kompleks tirosin terutama setelah simulasi mencapai 30 ns hingga 150 ns. Berbeda halnya dengan kuersittrin yang stabilitasnya konstan mulai dari awal simulasi (pada posisi 0 ns) hingga akhir simulasi (pada posisi 200 ns).



Gambar 4. Perbandingan grafik *Root Mean Square Deviation* (RMSD) selama simulasi dinamika molekuler.

Apabila diambil nilai RMSD rata-rata selama simulasi berlangsung, diperoleh perbedaan rentang yang signifikan antara sistem kompleks tirosin dan kuersittrin, yaitu dengan nilai RMSD masing-masing sebesar $\pm 1,84$ Å, dan $\pm 1,73$ Å. Tahapan terakhir dilakukan perhitungan nilai energi bebas ikatan selama simulasi menggunakan metode *molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area* (MM/PBSA). Perhitungan energi bebas ikatan ini dihitung berdasarkan trajektori dari awal simulasi hingga akhir simulasi dinamika molekuler.

Tabel 3. Energi bebas ikatan hasil perhitungan MM/PBSA.

Sistem Kompleks	ΔE_{vdw} (kJ/mol)	ΔE_{ele} (kJ/mol)	ΔG_{PB} (kJ/mol)	ΔG_{NP} (kJ/mol)	ΔG_{Bind} (kJ/mol)
Tirosin + Enzim Tyrosinase	-45,18	93,04	56,09	-6,25	97,69
Kuersittrin + Enzim Tyrosinase	-115,78	96,18	148,57	-16,73	-80,12

Keterangan: ΔE_{vdw} = kontribusi van der Waals, ΔE_{ele} = kontribusi elektrostatis, ΔG_{PB} = kontribusi desolvasi polar, ΔG_{NP} = kontribusi desolvasi non-polar.

Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa kuersittrin memiliki energi bebas ikatan sebesar -80,12 kJ/mol selama simulasi dinamika molekuler. Sementara tirosin memiliki energi bebas ikatan positif sebesar 97,69 kJ/mol. Fenomena tersebut dapat diprediksi karena adanya interaksi yang tidak diinginkan (*unfavorable interaction*) di sekitar area sisi aktif. Pada sistem kompleks kuersittrin energi yang paling banyak berkontribusi selama simulasi adalah interaksi Van der Waals dan interaksi elektrostatis. Hal tersebut karena metode MM/PBSA memungkinkan pengamatan terhadap pengaruh proses solvasi terhadap sistem kompleks (Muchtari *et al.*, 2018).

KESIMPULAN

Dari hasil uji diketahui senyawa turunan flavonoid yang terkandung dalam kulit buah coklat yakni apigenin, epikatekin, katekin, kaempferol, kuersetin, dan kuersittrin dapat berikatan dengan sisi aktif enzim tyrosinase dengan energi ikatan berturut-turut adalah -6,14; -6,17; -6,01; -5,89; -6,13; -6,81 kkal/mol dengan ikatan yang lebih kuat dibandingkan dengan ligan alaminya yang memiliki energi ikatan -4,91 kkal/mol. Interaksi molekuler yang terjadi antara senyawa flavonoid dengan sisi aktif enzim berupa ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan juga ikatan dengan logam Cu. Studi dinamika molekuler menunjukkan bahwa kuersittrin (dengan energi ikatan paling baik), memiliki stabilitas yang baik, dengan nilai RMSD rata-rata dan energi bebas ikatan MM/PBSA masing-masing sebesar $\pm 1,73$ Å dan -80,12 kJ/mol.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Karim, A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Abd Gani, S. S., Zainudin, B. H., and Abdullah, N. A., 2014. Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Wrinkles and Tyrosinase Inhibitory Activities of Cocoa Pod Extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(1), 1-13. doi: 10.1186/1472-6882-14-381.
- Adnyani, K. D., Lestari, L. W. E., Prabowo, H., Siaka, P. A. I. A., and Laksmiani, N. P. L., 2019. Aktivitas dari Kuersetin Sebagai Agen Pencerah Kulit Secara *in silico*. *Jurnal Kimia* 13(2), 207-212. doi: 10.24843/jchem.2019.v13.i02.p14.
- Al-Khafaji, K., and Taskin Tok, T., 2020. Molecular Dynamics Simulation, Free Energy Landscape and Binding Free Energy Computations in Exploration the Anti-Invasive Activity of Amygdalin Against Metastasis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 195, 105660. doi: 10.1016/j.cmpb.2020.105660.
- Asadzadeh, A., Fassihi, A., Yaghmaei, P., and Pourfarzam, M., 2015. *In silico* Approach for Designing Potent Inhibitors Against Tyrosinase. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12. doi: 10.13005/bbra/2188.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., and Oomah, B. D., 2018. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Pod Husk: Renewable Source of Bioactive Compounds. *Trends in Food Science and Technology* 81, 172-184. doi: 10.1016/j.tifs.2018.09.022.
- Chang, T. S., 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440-2475. doi: 10.3390/ijms10062440.
- Dahmani, K., Galai, M., Ouakki, M., Cherkaoui, M., Touir, R., Erkan, S., Kaya, S., and El Ibrahim, B., 2021. Quantum Chemical and Molecular Dynamic Simulation Studies for the Identification of the Extracted Cinnamon Essential Oil Constituent Responsible for Copper Corrosion Inhibition in Acidified 3.0 Wt% NaCl Medium. *Inorganic Chemistry Communications*, 124, 108409. doi: 10.1016/j.inoche.2020.108409.
- De, B., Adhikari, I., Nandy, A., Saha, A., and Goswami, B. B., 2018. *In silico* Modelling of Azole Derivatives With Tyrosinase Inhibition Ability: Application of the Models for Activity Prediction of New Compounds. *Computational Biology and Chemistry*, 74, 105-114. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.03.007.
- Fakhri, T. M., and Dewi, M. L., 2020. *In silico* Identification of Characteristics Spike Glycoprotein of SARS-CoV-2 in the Development Novel Candidates for COVID-19 Infectious Diseases. *Journal of Biomedicine and Translational Research* 6(2), 48-52. doi: 10.14710/jbtr.v6i2.7590.
- Fakhri, T. M., Dewi, M. L., and Syahrani, E., 2020. Magainin as an Antiviral Peptide of SARS-CoV-2 Main Protease for Potential Inhibitor: An *In silico* Approach. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi* 8(1), 104-110. doi: 10.24252/bio.v8i1.13871.
- Fujieda, N., Umakoshi, K., Ochi, Y., Nishikawa, Y., Yanagisawa, S., Kubo, M., Kurisu, G., and Itoh, S., 2020. Copper-Oxygen Dynamics in the Tyrosinase Mechanism. *Angewandte Chemie - International Edition* 132(32), 13487-13492. doi: 10.1002/anie.202004733.
- Gaillard, T., 2018. Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 Benchmark. *Journal of Chemical Information and Modeling* 58(8), 1697-1706. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00312.
- Gao, H., Nishida, J., Saito, S., and Kawabata, J., 2007. Inhibitory Effects Of 5,6,7-Trihydroxyflavones on Tyrosinase. *Molecules* 12(1), 86-97. doi: 10.3390/12010086.
- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., and Lee, R. E., 2009. Validation Of Molecular Docking Programs For Virtual Screening Against Dihydropteroate Synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling* 49(2), 444-460. doi: 10.1021/ci800293n.
- Ironi, A. E., Olawuyi, A. D., Lawal, B. S., Boligon, A. A., Olasupo, F., and Olalekan, S. I., 2019. Comparative Inhibitory Effects Of Cocoa Bean and Cocoa Pod Husk Extracts on Enzymes Associated With Hyperuricemia and Hypertension in Vitro. *International Food Research Journal* 26(2), 557-564.
- Kim, D., Park, J., Kim, J., Han, C., Yoon, J., Kim, N., Seo, J., and Lee, C., 2006. Flavonoids as Mushroom Tyrosinase Inhibitors: A Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(3), 935-941. doi: 10.1021/jf0521855.
- Ma, F., Zhao, Y., Gong, X., Xie, Y., and Zhou, X., 2014. Optimization of Quercitrin and Total Flavonoids Extraction from Herba Polygoni Capitati by Response Surface Methodology. *Pharmacognosy Magazine* 10(40), 385. doi: 10.4103/0973-1296.127343.
- Md Yusof, A. H., Abd Gani, S. S., Zaidan, U. H., Halmi, M. I. E., and Zainudin, B. H., 2019. Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Condition for Flavonoid Compounds from Cocoa Shells (*Theobroma cacao*) Using Response Surface Methodology. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(4), 711. doi: 10.3390/molecules24040711.
- Muchtaridi, M., Jajuli, M., and Yusuf, M., 2018. Antagonistic Mechanism of Chalcone Derivatives Against Human Estrogen Alpha of Breast Cancer Using Molecular Dynamic Simulation. *Oriental Journal of Chemistry*

- 34(6), 2735. doi: 10.13005/ojc/340607.
- Muhammad, S., and Fatima, N., 2015. *In silico* Analysis and Molecular Docking Studies of Potential Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Using Quercetin Glycosides. *Pharmacognosy Magazine* 11(Suppl 1), S123. doi: 10.4103/0973-1296.157712.
- Nesterov, A., Zhao, J., and Jia, Q., 2008. Natural Tyrosinase Inhibitors for Skin Hyperpigmentation. *Drugs of the Future* 33, 945-954. doi: 10.1358/dof.2008.033.11.1254240.
- Nguyen, H. X., Nguyen, N. T., Nguyen, M. H. K., Le, T. H., Do, T. N., Hung, T. M., and Nguyen, M. T. T., 2016. Tyrosinase Inhibitory Activity of Flavonoids from *Artocarpus heterophyllous*. *Chemistry Central Journal* 10(1), 1-6. doi: 10.1186/s13065-016-0150-7.
- Nieuweboer-Krobotova, L., 2013. Hyperpigmentation: Types, Diagnostics and Targeted Treatment Options. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 27, 2-4. doi: 10.1111/jdv.12048.
- Priani, S. E., Aprilia, S., Aryani, R., and Purwanti, L., 2019. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activity of Face Serum Containing Cocoa Pod Husk Phytosome (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 9(10), 110-115. doi: 10.7324/JAPS.2019.91015.
- Ramadhan, D. S. F., Fakhri, T. M., and Arfan, A., 2020. Activity Prediction of Bioactive Compounds Contained in *Etligeria elatior* Against the SARS-CoV-2 Main Protease: An *in silico* Approach. *Borneo Journal of Pharmacy* 3(4), 235-242. doi: 10.33084/bjop.v3i4.1634.
- Senol, F., Khan, M., Orhan, G., Gurkas, E., Orhan, I., Oztekin, N., and Ak, F., 2014. *In silico* Approach to Inhibition of Tyrosinase by Ascorbic Acid Using Molecular Docking Simulations. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 14(12), 1469-1472. doi: 10.2174/1568026614666140610121253.
- Şöhretoğlu, D., Sari, S., Barut, B., and Özel, A., 2018. Tyrosinase Inhibition by Some Flavonoids: Inhibitory Activity, Mechanism by *in Vitro* and *in silico* Studies. *Bioorganic Chemistry* 81, 168-174. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.08.020.
- Xie, L., Chen, Q., Huang, H., Wang, H., and Zhang, R., 2003. Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochemistry* 68(4), 487-491. doi: 10.1023/A:1023620501702.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., and Saboury, A. A., 2019. A Comprehensive Review on Tyrosinase Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34(1), 279-309. doi: 10.1080/14756366.2018.1545767.