

Studi *in Silico* Lima Senyawa Aktif sebagai Penghambat Protein Virus Dengue

In Silico Study of Five Active Compounds as Dengue Virus Protein Inhibitors

Reni Herman

Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan, Jakarta, Indonesia

*E-mail: reni.hermann1@gmail.com

Diterima: 11 Januari 2019

Direvisi: 4 Februari 2019

Disetujui: 22 Februari 2019

Abstrak

Infeksi dengue merupakan salah satu penyakit endemik di daerah tropis dan subtropis, disebabkan oleh infeksi virus dengue (DENV). Beberapa senyawa sudah dibuktikan memiliki efek antivirus terhadap beberapa virus. Uji *in silico* dilakukan untuk memprediksi stabilitas ikatan senyawa dari bahan alam untuk senyawa artemisinin, katekin, mangiferin, epigallocatekin galat (EGCG), dan kuersetin dengan protein virus dengue pada tingkat molekuler. Uji ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Molecular Operating Environment* (MOE) versi 2008.10. Ligan adalah senyawa ribavirin sebagai kontrol antiviral sedangkan artemisinin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin dengan struktur 3D format mol. Protein DENV dengan format dokumen PDB yang diunduh adalah protein selubung (*envelope*) DENV serotipe 2 dengan kode 1OKE, protein non struktural 3 (NS3) dengan kode 2VBC dan protein NS5 dengan kode 1L9K. Uji *in silico* ini secara umum memperlihatkan senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki stabilitas ikatan yang lebih baik terhadap protein DENV. Secara khusus senyawa mangiferin memiliki stabilitas ikatan lebih baik pada protein selubung, NS3 (helikase dan protease) dan pada NS5-metiltransferase dibandingkan dengan senyawa ribavirin. Senyawa katekin pada NS3-protease, EGCG pada NS3 (helikase dan protease) dan kuersetin pada NS3-protease. Artemisinin memiliki ikatan yang kurang stabil dibandingkan dengan ribavirin. Hasil prediksi ini mengindikasikan bahwa senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki potensi untuk menghambat protein DENV dan mangiferin merupakan senyawa yang memiliki potensi hambatan paling baik dengan ikatan lebih stabil pada semua protein yang diuji.

Kata Kunci: Antiviral; Katekin; Mangiferin; EGCG; Kuersetin

Abstract

Dengue infection is an endemic disease in the tropics and subtropics, caused by dengue virus (DENV) infection. Some compounds have been shown to have antiviral effects on some viruses. In silico study is conducted to predict the stability of natural ingredient compounds: artemisinin, catechin, mangiferin, epigallocatechin gallate (EGCG), and quercetin in their interactions with dengue virus proteins at molecular level. This study is carried out using the 2008 version of the Molecular Operating Environment (MOE) software. Ligands are ribavirin as antiviral control whereas artemisinin, mangiferin, EGCG, and quercetin with 3D mole format structures. The downloaded DENV protein with PDB document format is the DENV serotype 2 envelope protein with 1OKE code, non structural protein 3 (NS3) with 2VBC code and NS5 protein with 1L9K code. In silico test generally showed that catechin, mangiferin, EGCG, and quercetin had more stable docking ligands to DENV's proteins. In particular, mangiferin had stable docking ligand to envelope proteins, NS3 (helicase and protease) and in NS5-methyltransferase compared to ribavirin. Catechin stabled on NS3-protease, EGCG on NS3 (helicase and protease) and quercetin on NS3-protease. Artemisinin had less stabled bonds than ribavirin. The results indicated that catechin, mangiferin, EGCG, and quercetin had potential inhibition to DENV proteins whereas mangiferin was the most potential compound to inhibit dengue virus protein targets.

Keywords: Antiviral; Catechin; Mangiferin; EGCG; Quercetin

PENDAHULUAN

Infeksi virus dengue merupakan salah satu penyakit endemik di daerah tropis dan subtropis yang disebabkan oleh empat serotipe virus dengue. Belum ada pengobatan spesifik untuk infeksi dengue. Virus dengue (DENV) berupa partikel sferis dengan diameter 40–50 nm, diliputi oleh lipopolisakarida. DENV memiliki genom sebesar ~11 kb dengan materi genetik RNA untai tunggal *sense* positif. Genom mengkode 3 protein struktural dan 7 protein nonstruktural (NS). Protein struktural terdiri dari *capsid* (C), *envelope* (E) dan *pre-membrane/membrane* (prM/M). Protein nonstruktural terdiri dari NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5.¹

Beberapa protein DENV yang telah diketahui berperan penting pada proses infeksi dan replikasi yaitu protein selubung (*envelope*), NS3 protease/helikase dan NS5 metiltransferase/RdRp. Protein selubung berperan penting pada saat infeksi karena memediasi perlekatan virus dengan reseptor pada permukaan sel.² Senyawa yang dapat menghambat proses ini berpeluang untuk dikembangkan sebagai antivirus. Protein struktural 3 (NS3) merupakan protein yang ditemukan di dalam sel, terdiri dari 2 domain yaitu protease dan helikase. Protease ini berperan untuk proses pemotongan poliprotein yang penting untuk replikasi virus di dalam sel³ dan helikase berperan dalam proses replikasi genetik virus.⁴ Protein nonstruktural 5 (NS5) terdiri dari 2 domain yaitu metiltransferase dan *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) yang berperan pada replikasi RNA virus.¹

Beberapa senyawa bahan alam dilaporkan memiliki kemampuan sebagai antiviral seperti epigalokatekin galat (EGCG) terhadap infeksi virus hepatitis C,⁵

mangiferin dapat menghambat infeksi HIV,⁶ kuersetin dapat menghambat virus influenza A,⁷ katekin dapat menghambat virus zika,⁸ dan artemisinin dapat menghambat sitomegalovirus.^{9,10} Pada studi ini diprediksi interaksi dan stabilitas ikatan terbaik dari senyawa bahan alam: artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin terhadap protein virus dengue pada tingkat molekuler menggunakan simulasi komputer (*in silico*). Ikatan senyawa ini diharapkan dapat menghambat aktivitas protein dan proses replikasi virus.

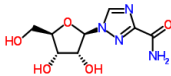
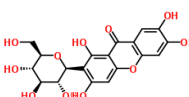
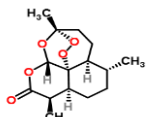
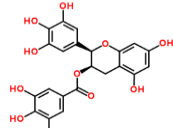
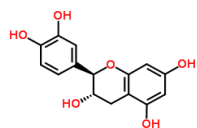
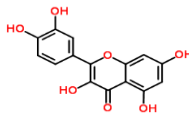
METODE

Pengambilan data dan pemodelan molekul senyawa bahan alam

Pada penelitian ini uji dilakukan dengan perangkat lunak *Molecular Operating Environment* (MOE) versi 2008.10. Sebagai data pembanding dipersiapkan data ligan yaitu ribavirin. Artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin menggunakan struktur 3D dengan format mol yang diunduh melalui <http://chemspider.com/> (Tabel 1). Situs ini menyediakan database struktur senyawa untuk keperluan *virtual screening*. Perangkat lunak melakukan minimalisasi energi terhadap keenam struktur senyawa tersebut dengan metode *forcefield* untuk mendapatkan molekul yang paling stabil.¹¹

Struktur protein struktural DENV dengan format dokumen pdb (protein data bank) diunduh melalui portal informasi struktur biologi makromolekuler RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), dan PDBJ (protein data bank Japan) melalui situs <http://pdj.org/>. Protein yang diunduh adalah protein selubung (*envelope*) DENV-2 (kode: 1OKE), protein NS3 (kode: 2VBC), dan NS5 (kode: 1L9K).

Tabel 1. Struktur senyawa ribavirin, artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin

Nama Senyawa	Struktur	Nama Senyawa	Struktur
Ribavirin		Mangiferin	
Artemisinin		EGCG	
Katekin		Kuersetin	

Preparasi protein target dan simulasi

Preparasi protein dilakukan dengan menambahkan molekul polar untuk menyamakan kondisi di dalam larutan. Berikutnya dilakukan pencarian sisi aktif yang dapat berikatan dengan ligan. *Docking* molekul dilakukan di antara sisi aktif pada protein DENV dengan senyawa. Protonasi 3D dan minimalisasi energi menggunakan parameter *force field*, AMBER99 + salvation, gradient 0,05. Struktur ini yang kemudian digunakan sebagai reseptor untuk analisis *docking*.

Active site finder digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkalkulasi posisi aktif pada reseptor molekul. Parameter yang digunakan adalah *London dG*, *placement: triangle matcher*, *Retain: 10*, *refinement: forcefield* dan *re-scoring 2: London dG*. Hasil ditampilkan dalam bentuk energi yang paling kecil pada ikatan ligan dengan protein struktural DENV.

Analisis

Hasil analisis menampilkan posisi ikatan antara kelima senyawa dengan protein, gugus yang mengadakan ikatan hidrogen

dengan asam amino serta kekuatan ikatan yang ditampilkan dalam bentuk nilai energi bebas Gibbs (ΔG). Nilai ini merupakan parameter kekuatan ikatan dengan reseptor. Semakin rendah nilai ΔG , ikatan ligan dengan reseptor semakin stabil. Selain itu juga ditampilkan konstanta inhibisi (pKi) untuk menentukan afinitas ikatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambatan molekul atau *molecular docking* merupakan metode komputasi yang digunakan untuk menghitung afinitas ikatan maupun memperkirakan tempat ikatan senyawa dengan protein.¹² Prosedur ini digunakan sebagai acuan untuk menentukan orientasi yang baik dari suatu senyawa dengan senyawa yang telah dijadikan obat yang sifatnya relatif. Uji ini dilakukan untuk memprediksi kemampuan senyawa artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin untuk berikatan dengan protein virus dengue. Hasil uji lima senyawa ini secara *in silico* ditampilkan pada Tabel 2 dengan senyawa ribavirin sebagai pembanding. Tabel 3 menunjukkan interaksi ligan dengan protein, residu, tipe ikatan, skor

Tabel 2. Nilai ΔG (kkal/mol) hasil uji *in silico* artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin

Protein Virus Dengue	Ribavirin	Artemisinin	Katekin	Mangiferin	EGCG	Kuersetin
Selubung (<i>Envelope</i>) DENV	-10,1510	-6,7842	-10,6318	-12,1607*	-10,7043	-11,1121
NS3-Protease	-11,4780	-9,3786	-14,7234	-15,0470	-15,7316*	-15,7530*
NS3-Helicase	-12,2861	-8,4054	-16,8596*	-15,7248	-17,6025*	-13,0082
NS5-Metil transferase	-10,3158	-8,3839	-14,7972	-17,6264*	-13,8701	-14,6770

Ket: * = Nilai yang dianggap paling stabil

pengikatan, jarak atom serta afinitas ikatan dari senyawa yang memiliki nilai ΔG paling baik. Secara umum nilai ΔG pada masing-masing protein lebih rendah pada katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin dibandingkan dengan senyawa ribavirin dan artemisinin, yang artinya ikatan senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin lebih stabil terhadap protein DENV dibandingkan dengan ribavirin dan artemisinin. Masing-masing senyawa ini juga memiliki nilai ΔG paling rendah pada protein tertentu, seperti katekin memiliki nilai ΔG paling rendah pada ikatan dengan NS3-helikase, EGCG pada NS-3 (protease dan helikase) dan kuersetin pada protein NS3-protease. Mangiferin memiliki nilai ΔG lebih rendah pada hampir semua protein. Berdasarkan hasil ini kemudian ditampilkan interaksi ligan dan protein, residu, tipe ikatan, skor pengikatan, jarak atom, dan konstanta inhibisi dari senyawa yang memiliki nilai ΔG paling rendah pada Tabel 3. Berikut adalah rincian hasil uji *in silico*.

Katekin

Dibandingkan dengan senyawa lain, katekin memiliki ikatan paling stabil jika berikatan dengan NS3-helikase, dengan nilai nilai ΔG -16.8596 kkal/mol dan konstanta inhibisi 11.286 μM . Katekin berikatan pada 4 residu, 2 *site* donor H dan 3 *site* akseptor H. Skor pengikatan paling baik pada residu

Lys 398 dengan jarak atom 2.77 Å (Tabel 2 dan 3).

Mangiferin

Hasil analisis *in silico* menunjukkan ikatan senyawa mangiferin dengan selubung DENV memiliki ikatan paling stabil dibandingkan dengan ikatan senyawa lain pada protein yang sama. Hasil uji memberikan nilai energi bebas (ΔG) -12.1607 kkal/mol dengan konstanta inhibisi (pKi) 9.604 μM . Interaksi ikatan ditampilkan pada Tabel 3. Mangiferin berikatan pada 2 *site* sebagai donor H dan 5 *site* sebagai akseptor H. Skor pengikatan tinggi pada residu Gln 271 sebesar 98,1% dan jarak atom 1.69 Å. Mangiferin juga memiliki nilai ΔG paling baik jika berikatan dengan protein metiltransferase. Nilai ΔG 17.6264 kkal/mol dan nilai pKi 11.356 μM . Senyawa ini berikatan dengan 9 residu, 6 *site* donor H dan 5 *site* akseptor H. Skor paling tinggi pada ikatan dengan residu Lys 61 dengan jarak 2,79 Å (Tabel 3).

EGCG

Senyawa EGCG memiliki ikatan lebih stabil jika berikatan dengan NS3-protease dan NS3-helikase. Ikatan dengan NS3 protease memiliki nilai ΔG -15.7316 kkal/mol dengan nilai pKi 11.955 μM . Katekin berikatan pada 7 residu, 6 *site* donor H, dan 3 *site* akseptor H. Skor pengikatan

paling tinggi sebesar 85,3% dengan jarak atom 2.7 Å. Ikatan EGCG juga paling baik dengan NS3-helikase, nilai ΔG -17.6025 kkal/mol dan konstanta inhibisi (pKi) 12.016

μM . Berikatan pada 4 residu, 4 *site* donor H dan 3 *site* akseptor H. Skor pengikatan paling besar 56.4% dengan jarak atom 2.80 Å (Tabel 2 dan 3).

Tabel 3. Hasil prediksi ikatan ligan dengan protein virus dengue berdasarkan nilai δg terbaik

Senyawa dengan ikatan paling baik	Interaksi ligan dan protein	Residu	Tipe Ikatan	Skor Pengikatan (%)	Jarak (Å)	Konstanta Inhibisi (pKi)
Katekin-helikase		ALA 419*	H-don	10.5	3.74	11.286
		ALA 419*	H-don	45.3	1.97	
		LYS 199*	H-acc	63.1	2.75	
		LYS 398	H-acc	86.1	2.77	
		ARG 418*	H-acc	11.0	3.32	
Mangiferin: - selubung (<i>envelope</i>)		GLN 52	H-don	35.4	2.20	9.604
		GLN 271	H-don	98.1	1.69	
		GLN 52	H-acc	38.9	2.95	
		LYS 58	H-acc	73.3	2.79	
		LYS 58	H-acc	58.7	2.75	
		LYS 128	H-acc	33.2	2.82	
		GLN 200	H-acc	26.3	3.08	
- NS5 Metiltransferase		SER 56	H-don	76.9	2.70	11.356
		GLY 81	H-don	11.7	1.94	
		GLU 111	H-don	75.1	1.59	
		ASP 146	H-don	69.2	1.53	
		ASP 146	H-don	19.0	1.92	
		GLU 149	H-don	19.3	1.50	
		SER 56	H-acc	76.9	2.70	
		ARG 57*	H-acc	39.8	2.79	
		ARG 57*	H-acc	15.4	3.08	
		LYS 61	H-acc	81.0	2.79	
		LYS 181*	H-acc	61.0	2.72	

Hasil uji *in silico* pada Tabel 2 memperlihatkan nilai ΔG terhadap 5 senyawa yang diuji dan ribavirin sebagai kontrol antivirus. Ribavirin sudah diketahui memiliki efek antivirus terhadap DENV dan juga digunakan sebagai kontrol pada uji antivirus.¹³ Hasil uji ini mengindikasikan katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki nilai ΔG yang lebih baik dibandingkan artemisinin yang sudah dilaporkan memiliki efek antivirus¹⁰ dan memiliki nilai ΔG paling tinggi dengan prediksi stabilitas konformasi kompleks yang lebih rendah. Hasil ini juga menunjukkan senyawa katekin, EGCG, dan kuersetin memiliki stabilitas kompleks lebih tinggi pada protein NS3, sementara mangiferin memiliki stabilitas konformasi kompleks yang lebih tinggi pada empat protein DENV dibanding senyawa lainnya. Meskipun nilai ΔG mangiferin terhadap NS3-protease dan NS3-helikase kurang kuat dibanding katekin, EGCG, dan kuersetin namun ikatan H donor maupun akseptor pada mangiferin dan NS3 lebih banyak.

Selain penilaian ikatan ligan dengan protein, perlu juga dilihat lokasi interaksinya. Beberapa studi tentang proteomik virus dengue telah melaporkan bagian penting untuk infeksi atau *active site* dari protein DENV. Misalnya struktur protein selubung DENV, terdapat 3 domain yang penting untuk proses infeksi, yaitu domain I berfungsi proses perubahan konfirmasi ketika partikel DENV menempel dengan reseptor, domain II berperan pada saat fusi dengan membran sel dan domain III bagian yang menempel pada reseptor sel.¹⁴

Pada protease, telah dilaporkan residu yang berperan penting pada proses replikasi yaitu His 51, Asp 75, dan Ser 135.¹⁵ Hasil uji menunjukkan EGCG berikatan dengan Asp 75 (Tabel 3). Studi lain juga melaporkan residu yang berperan sebagai *active site* pada protein NS3-helikase,¹⁵ hasil

uji pada katekin dan EGCG juga menunjukkan ada ikatan dengan residu yang penting untuk replikasi DENV (Tabel 3).

Beberapa residu juga telah dilaporkan berperan penting pada NS5 metiltransferase, residu yang dilaporkan penting untuk proses replikasi RNA DENV ini diantaranya adalah Phe 25, Lys 30, Arg 57, Lys 181, dan Arg 212.¹⁵ Hasil pada studi ini memperlihatkan mangiferin berikatan dengan residu Arg 57 dan Lys 18 (Tabel 3). Pada uji ini tidak dapat dilakukan prediksi terhadap protein NS5-RdRp karena tidak ditemukan struktur protein dengan format pdb.

Pada protein selubung dilaporkan 18 residu pada protein E DENV-3 yang berperan penting pada proses infeksi yaitu H149, I162, S104, R186 (DI), T76, N89, Y96, W101, F108, K110, N240, M258, H259, A265, I276 (DII), S296, S311, dan K321 (DIII).¹⁷ Hasil uji *molecular docking* ini memperlihatkan posisi ikatan mangiferin berada antara domain I dan II dari protein selubung. Asam amino pada domain II lebih nonpolar, berkaitan dengan proses fusi dengan membran sel.¹⁴

KESIMPULAN

Hasil uji menunjukkan bahwa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin secara *in silico* memiliki potensi sebagai penghambat protein virus dengue. Di antara senyawa tersebut yang memiliki potensi hambatan paling baik terhadap semua protein DENV adalah mangiferin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes yang atas izinnya studi ini dapat terlaksana dan Ibu Dra. Ani Isnawati, M.Kes atas masukan dan bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR RUJUKAN

1. Henschel EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Review*. 1990 Oct;3(4):376–96.
2. Alen MMF, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *Journal of Tropical Medicine*. 2012;2012:1-13.
3. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of Virology*. 2008 Jan;82(1):173–83.
4. Wang CC, Huang ZS, Chiang PL, Chen CT, Wu HN. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Letters*. 2009 Feb;583(4):691–6.
5. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British Journal of Pharmacology*. 2013 Mar;168(5):1059–73.
6. Wang RR, Gao YD, Ma CH, Zhang XJ, Huang CG, Huang JF, *et al.* Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. *Molecules*. 2011 May;16(5):4264–77.
7. Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, *et al.* Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses*. 2015 Dec;8(1):1-18.
8. Carneiro BM, Batista MN, Braga ACS, Nogueira ML, Rahal P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*. 2016 Sep;496:215–8.
9. Flobinus A, Taudon N, Desbordes M, Labrosse B, Simon F, Mazeron M-C, *et al.* Stability and antiviral activity against human cytomegalovirus of artemisinin derivatives. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Jan;69(1):34–40.
10. Roy S, He R, Kapoor A, Forman M, Mazzone JR, Posner GH, *et al.* Inhibition of human cytomegalovirus replication by artemisinins: effects mediated through cell cycle modulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Jul;59(7):3870–9.
11. Isnawati A, Adelina R. Studi docking molekuler catechin gallate, epicatechin gallate, galocatechin gallate, dan epigallocatechin gallate sebagai obat dislipidemia. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2015;5(1):25-32.
12. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided Drug Design*. 2011 Jun;7(2):146–57.
13. Chang J, Schul W, Butters TD, Yip A, Liu B, Goh A, *et al.* Combination of alpha-glucosidase inhibitor and ribavirin for the treatment of dengue virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*. 2011 Jan;89(1):26–34.
14. Wahala WMPB, Donaldson EF, Alwis R De, Loper MAA, Baric RS, Silva AM De. Natural Strain Variation and Antibody Neutralization of Dengue Serotype 3 Viruses. 2010;6(3):1–10.
15. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*. 2008 Aug;11(4):369–77.
16. Henderson BR, Saeedi BJ, Campagnola G, Geiss BJ. Analysis of RNA binding by the dengue virus NS5 RNA capping enzyme. *PLoS One*. 2011 Oct;6(10):1-9.
17. Christian EA, Kahle KM, Mattia K, Puffer BA, Pfaff JM, Miller A, *et al.* Atomic-level functional model of dengue virus envelope protein infectivity. *Proceeding of The National Academy Sciences*. 2013;110(46):1–6.