

ANALISIS PROTEIN TARGET SENYAWA ALAMI ANTI AGING FLAVAN-3-OL DARI *THEOBROMA CACAO L.*

Dianing Eka Puspitasari¹, Mohammad Amin², Betty Lukiati³

¹Mahasiswa Biologi Pascasarjana Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang no. 5, Malang

^{2,3}Dosen Biologi Pascasarjana Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang no. 5, Malang

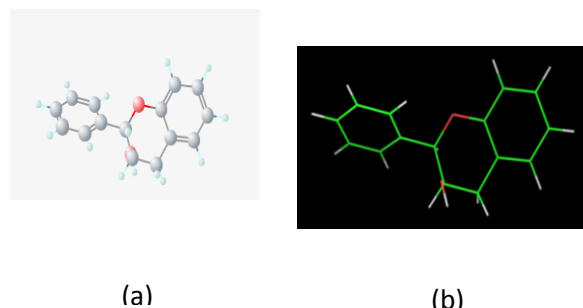
E-mail korespondensi: dianpuspitasari826@gmail.com

Abstrak: Penuaan pada kulit (*skin aging*) adalah proses perubahan dermatologis yang terjadi secara alami seiring dengan perkembangan usia manusia dan atau karena paparan radiasi UV yang tidak diimbangi dengan treatment penyembuhan maupun pencegahan yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi protein target dari senyawa *flavan-3-ol* dalam kaitannya dengan penuaan (*aging*) pada kulit manusia (*skin aging*). Senyawa *flavan-3-ol* yang digunakan pada penelitian *in silico* ini diperoleh dari database PubChem (Pubchem CID 3707243), kemudian kandidat protein target senyawa *flavan-3-ol* diprediksi menggunakan PharmMapper, SwissTargetPrediction, dan SuperPred *web server*. Kandidat protein target senyawa *flavan-3-ol* (CID 3707243) pada penelitian ini hanya diperoleh melalui PharmMapper dan SwissTargetPrediction *web server*. Protein yang muncul di kedua *web server* adalah CA1 (Carbonic Anhydrase 1) dan CA2 (Carbonic Anhydrase 2). Hasil kandidat protein yang diperoleh dari PharmMapper dan SwisTarget Prediction *web server* kemudian dilakukan prediksi *protein-protein networks analysis* melalui String-db *web server*. Berdasarkan kajian literatur, protein-protein yang berinteraksi sebagai kandidat protein target senyawa *flavan-3-ol* (CID 3707243) adalah MMP3 yang bertanggung jawab pada pembentukan *skin aging*.

Kata Kunci: *anti aging*, flavan-3-ol, protein target, MMP3

PENDAHULUAN

Indonesia sejak zaman dahulu telah mengenal tanaman yang mempunyai khasiat obat yang dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit. Tanaman yang berkhasiat obat tersebut dikenal dengan sebutan tanaman obat tradisional salah satunya adalah tanaman kakao atau tanaman cokelat. Kandungan *flavan-3-ol* yang berasal dari biji kakao/cokelat memiliki fungsi antioksidan. Aktivitas antioksidan dalam melawan radikal bebas tersebut termasuk di dalamnya adalah berkaitan dengan penghambatan penuaan sel/penuaan dini (*aging*). *Flavan-3-ol* termasuk dalam kelas polifenol, yang terdiri atas epikatekin, katekin dan prosianidin, ditemukan pada tumbuhan sebagai molekul-molekul terkonjugasi (Şentürk, 2015; Osakabe, 2013). *Flavan-3-ol* banyak terdapat dalam anggur, teh, dan kakao, dalam bentuk monomer (epikatekin dan katekin) atau dalam bentuk oligomer (prosiaanidin). *Flavan-3-ol* merupakan satu jenis senyawa fenolik yang tersebar di sejumlah makanan nabati dan suplemen makanan salah satunya di tanaman kakao. Kakao memiliki kelimpahan senyawa *flavan-3-ol* dari beberpa makanan. Telah dilaporkan bahwa kakao mengandung oligomer mulai dari dimer hingga dekamer *flavan-3-ol* (Osakabe, 2013). Manfaat polifenol khususnya *flavan-3-ol* yang lebih penting adalah dapat memberikan khasiat untuk penyembuhan beberapa penyakit dan menawarkan berbagai manfaat kesehatan misalnya meningkatkan aliran darah dermal, meningkatkan fotoproteksi dan berkontribusi dalam pemeliharaan kulit.



Gambar 1. a). Struktur 3 Dimensi *flavan-3-ol* CID 3707243 yang diperoleh dari Pubchem, b) Struktur 2 Dimensi *flavan-3-ol* dengan Pymol

(Sumber: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3707243#section=3D-Conformer>)

METODE PENELITIAN

a. Mengumpulkan Struktur 3D/SMILES Senyawa *Flavan-3-ol* dari PubChem

Struktur 3 dimensi/SMILES (C1C(C(OC2 =CC=CC=C21)C3=CC=CC=C3)O) senyawa *flavan-3-ol* yang digunakan pada penelitian *in silico* ini diperoleh dari database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) berupa *Sybl Data Files (*.sdf)* (Pangastuti, *et al.*, 2015). Hasil yang diperoleh adalah senyawa *flavan-3-ol* dengan Pubchem CID 37072432.

b. Memprediksi Protein Target Senyawa *Flavan-3-ol* CID 3707243 dari PharmMapper, SuperPred, dan SwissTarget Prediction

1) PharmMapper

Struktur 3 dimensi/SMILES (C1C(C(OC2 =CC=CC=C21)C3=CC=CC=C3)O) senyawa *flavan-3-ol* CID 3707243 diinput ke dalam PharmMapper *webservice* (<http://59.78.96.61/pharmmapper/help.php>) yang bertujuan untuk memprediksi protein-protein yang menjadi target interaksi senyawa *flavan-3-ol*. PharmMapper merupakan *web server* yang dapat digunakan untuk memprediksi target aktivitas suatu senyawa berdasarkan farmakopor (Pangastuti, *et al.*, 2015). Farmakopor merupakan pola interaksi ligan dengan reseptornya, berbasis farmakopor (*pharmacophore base/ligand base*). *Output file* dari PharmMapper didownload dengan format *comma-separated values (*.csv)*.

Hasil yang diperoleh dengan Job ID 160210025843 tersebut kemudian dibuat tabel untuk dikompilasi dengan data yang diperoleh menggunakan SuperPred dan Swiss Target Prediction. Superpred/Swis Target Prediction merupakan *web server* yang bisa digunakan untuk memprediksi target aktivitas suatu senyawa berdasarkan kemiripan suatu senyawa (*structure base similarity*). Output yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel kompilasi dan dianalisis secara manual. Hasil kompilasi selanjutnya digunakan sebagai data protein target yang akan dianalisis interaksinya menggunakan *String-db web server*.

2) SuperPred

Struktur 3 dimensi/SMILES (C1C(C(OC2 =CC=CC=C21)C3=CC=CC=C3)O) senyawa *flavan-3-ol* CID 3707243 diinput ke dalam SuperPred *webservice* (<http://prediction.charite.de/>). Output yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel kompilasi dan dianalisis secara manual. Hasil kompilasi selanjutnya digunakan sebagai data protein target yang akan dianalisis interaksinya menggunakan *String-db web server*.

3) SwissTargetPrediction

Struktur 3 dimensi/SMILES (C1C(C(OC2 =CC=CC=C21)C3=CC=CC=C3)O) senyawa *flavan-3-ol* CID 3707243 diinput ke dalam SwissTargetPrediction *webservice* (<http://swisstargetprediction.ch/>). File tersebut di *download* dengan format *comma-separated values (*.csv)*, kemudian dimasukkan ke dalam tabel kompilasi dan dianalisis secara manual. Hasil kompilasi selanjutnya digunakan sebagai data protein target yang akan dianalisis interaksinya menggunakan *String-db web server*.

c. Validasi Fungsi Protein Target

1) Protein Targets Profiling

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari PharmMapper, SuperPred, dan SwissTargetPrediction, protein-protein target tersebut dilengkapi dengan beberapa informasi mengenai Gene ID, nama sinonim, fungsi molekuler dan kinerja masing-masing protein yang berhubungan dengan proses metabolik di dalam tubuh manusia dapat menggunakan referensi database dari Uniprot (<http://prediction.charite.de/>).

2) Prediksi Protein-Protein Networks Menggunakan String-DB

Kumpulan/hasil kompilasi nama gen pengkode protein-protein target *flavan-3-ol* CID 3707243 selanjutnya dimasukkan ke dalam *String-db* (<http://string-db.org/>) yang bertujuan untuk memprediksi interaksi antara suatu protein target dengan protein-protein target lainnya, kemudian dianalisis protein-protein target yang terlibat melalui studi literatur terkait protein yang bertanggung jawab dalam proses *skin aging*. Hasil analisis berdasarkan kajian literatur diperoleh bahwa MMP3 merupakan kandidat protein senyawa *flavan-3-ol* CID 3707243 yang bertanggung jawab dalam pembentukan *skin aging*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penuaan kulit (*skin aging*) merupakan proses yang kompleks yang disebabkan oleh penyebab intrinsik dan eksogen. Penuaan kulit berdasarkan penyebab intrinsik adalah penuaan kulit yang tidak dapat dihindari, sedangkan penyebab eksogen adalah penuaan yang disebabkan oleh lingkungan yang berbahaya, tetapi masih bisa dicegah. Kerusakan foto oksidatif yang disebabkan oleh radiasi sinar UV matahari merupakan penyebab utama penuaan kulit. Fenomena ini disebut *photo aging*. Sebagian besar kerusakan UV dapat dihubungkan dengan kelebihan fotokimia ROS, yang menginduksi jalur cascade molekul kompleks yang dapat

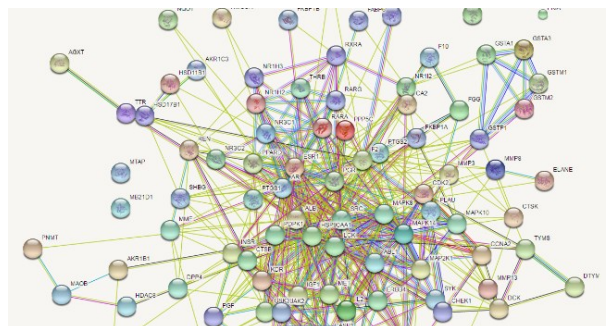
mengaktifkan peradangan (inflamasi) untuk mempercepat penuaan fisiologis dan menentukan degenerasi dermal/epidermal. ROS dan RNS dapat merusak komponen-komponen seluler yang penting (DNA, protein, lipid) dan juga mempengaruhi regulasi molekul sinyal, seperti MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), *inflammatory cytokins* seperti *nuclear factor-k β* (NF-k β) dan *activator protein-1* (AP-1). Sinar UV dapat menginduksi aktivasi sistem enzimatis, misalnya lipoxygenase (LOX) dan cyclooxygenase (COX) akan mengkatalisis pembentukan mediator tambahan penyebab inflamasi. Kulit yang teradiasi oleh paparan sinar UV matahari dilaporkan pula memberikan kontribusi untuk perkembangan kanker kulit (Scapgnini, *et al.*, 2014).

Tren terbaru dalam penelitian *anti aging* diproyeksikan/digambarkan melalui penggunaan senyawa antioksidan yang berasal dari tumbuhan. Asam fenolik, flavonoid dan berat molekul yang kaya akan polifenol adalah beberapa senyawa antioksidan yang mampu melindungi kulit manusia terhadap efek berbahaya dari radiasi sinar ultraviolet, yaitu *photoaging* dan perkembangan sel kanker. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa biji kakao mengandung polifenol dan memiliki efek kesehatan terutama berperan dalam fungsi anti radikal bebas (Wahab, *et al.*, 2014). Sebuah studi *in vitro* juga menunjukkan bahwa epikatekin (*flavan-3-ol*) dapat berperan melindungi fibroblas dalam kulit dari induksi sinar UV (Yoon, *et al.*, 2016; Scapgnini, *et al.*, 2014).

Penelitian yang dilakukan pada hewan pengerat telah menunjukkan bahwa ekstraksi senyawa fenolik dari bubuk kakao (yang mengandung 468 mg/g asam gallic yang setara dengan fenolik dan 413 mg/g epikatekin yang setara dengan *flavan-3-ol*) sangat kuat menghambat induksi ekspresi COX-2, aktivasi MAPKs dan sinyal NF-k β di 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) yang diperlakukan pada kulit tikus. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak polifenol dari kakao efektif menghambat TNF- α menginduksi ekspresi VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dalam sel epidermis tikus. Efek ini terkait dengan kemampuan polifenol dalam kakao untuk memblokir aktivasi TNF- α yang menginduksi aktivasi *nuclear transcription factors*, AP-1 dan NF-k β yang merupakan regulator kunci ekspresi VEGF. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa polifenol di dalam kakao telah terbukti positif mempengaruhi beberapa parameter elastisitas kulit yaitu glikosamoglikan dan kolagen I, III dan IV (Scapgnini, *et al.*, 2014).

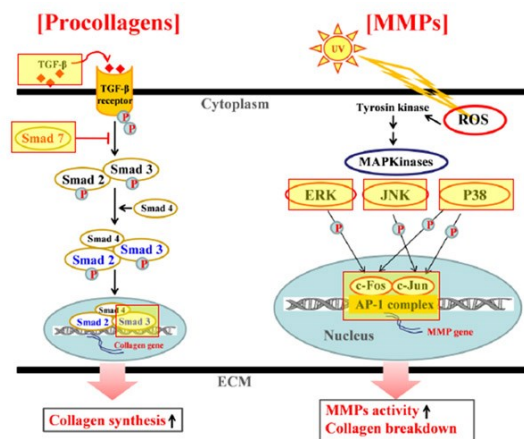
Kandidat protein target senyawa *flavan-3-ol* (CID 3707243) pada penelitian ini hanya diperoleh melalui PharmMapper dan SwissTargetPrediction *web server*. Kandidat protein senyawa *flavan-3-ol* yang diperoleh melalui PharmMapper *webservice* (Job ID: 160210025843) adalah 131 protein dan 15 protein melalui SwissTargetPrediction *webservice*. Berdasarkan hasil kompilasi tersebut diperoleh 146 protein yang merupakan kandidat protein target senyawa *flavan-3-ol* (CID 3707243). Protein target yang terdapat di kedua *web server* adalah CA1 (*Carbonic Anhydrase 1*) dan CA2 (*Carbonic Anhydrase 2*).

Hasil kandidat protein yang diprediksi oleh PharmMapper dan SwissTargetPrediction *webservice* yang kemudian diprediksi oleh String-db *webservice* untuk dilakukan *protein-protein networks analysis*, diketahui bahwa terdapat 104 interaksi yang terjadi pada manusia (*Homo sapiens*). Beberapa protein yang berinteraksi, terdapat protein MMP3 yang merupakan salah satu protein yang berperan penting dalam *skin aging*. MMP3/Stromelysin-1 dapat mendegradasi fibronectin, laminin, gelatin tipe I, II, IV, dan V; kolagen III, IV, X dan IX, dan *cartilage proteoglycans* dan mengaktifkan *procollagenase* (Uniprot, 2016).



Gambar 2. Interaksi Protein-Protein Target Senyawa *Flavan-3-ol*
Sumber: <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=bM9N7vI3yEan>

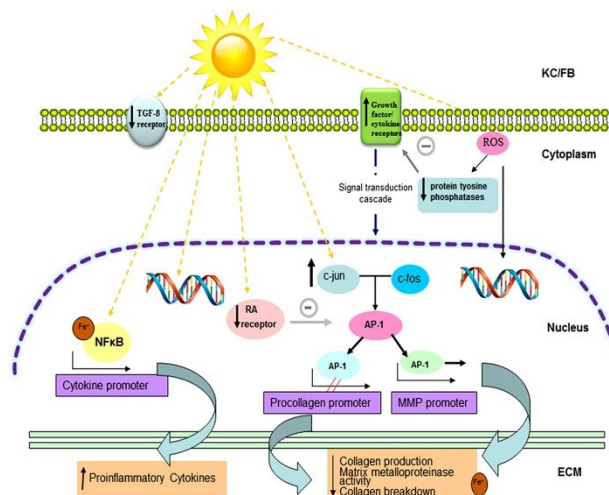
AP-1 sangat berperan dalam mengatur transkripsi dari beberapa MMPs (matriks-metaloproteinase). Secara khusus, MMP1 (kolagenase interstitial atau kolagenase 1), MMP9 (gelatinase B), dan metaloproteinase matriks-3 (stromelysin 1) diregulasi oleh AP-1. MMP1 menginisiasi degradasi dari kolagen tipe I dan III, dan MMP9 mendegradasi fragmen kolagen yang dihasilkan oleh kolagenase. Metaloproteinase matriks-3 (MMP3) tidak hanya mendegradasi membran basement kolagen tipe IV tetapi juga mengaktifkan proMMP1. Kerusakan akibat induksi UV ke jaringan ikat kulit membutuhkan induksi MMP, yaitu MMP1, MMP3, dan MMP9 yang secara sempurna mendegradasi kolagen matang (*mature collagen*) di kulit. Setiap anggota MMP memiliki fungsi yang unik pada kulit UVB-iradiasi. MMP1 terutama bertanggung jawab untuk degradasi ECM, dan peningkatan ekspresi dari MMP1 dan metaloproteinase matriks-3 (enzim dekomposisi kolagen) yang diyakini menyebabkan degradasi kolagen (Gambar 3). Dengan demikian, diketahui bahwa radiasi UV menyebabkan degradasi ekstraseluler matriks melalui induksi faktor transkripsi AP-1 dan kenaikan berikutnya di produksi MMPs pada kulit manusia (Kim., *et al.*, 2013)



Gambar 3. Jalur Sinyal Sel Pembentukan MMPs dan Procollagen
Sumber: Shim, J. S. *et al.*, 2008.

Akibat terpapar radiasi UVB Metalloproteinase 3 (matriks metaloproteinase-3) diregulasi sehingga mengalami peningkatan, sedangkan kolagen III- α (COL3A1), kolagen I- α (COL1A1), jaringan ikat faktor pertumbuhan (CTGF) dan fibromodulin (FMOD) mengalami degradasi. Penuaan akibat induksi UVB juga terbukti merangsang ekspresi Matriks Metalloproteinase dalam mendegradasi kolagen sehingga Matriks Metalloproteinase 3 dikenal sebagai penyumbang utama proses *photoaging* kulit (Borlon, *et al.*, 2008).

UVB dan UVA menghasilkan stres oksidatif pada kulit melalui interaksi dengan kromofor seluler dan fotosensitizer, mengakibatkan kerusakan genetik sementara dan permanen dan aktivasi jalur transduksi sinyal sitoplasma, dan dengan demikian menyebabkan perubahan dalam ekspresi gen yang berhubungan dengan pertumbuhan, diferensiasi, penuaan replikatif dan degradasi jaringan ikat. ROS memainkan peran penting dalam metabolisme kolagen (Gambar 4). Mereka tidak hanya secara langsung merusak kolagen interstitial, tetapi juga menonaktifkan inhibitor jaringan metalloprotease dan menginduksi sintesis dan aktivasi MMPs (MMP3) yang ditingkatkan regulasinya tersebut (Ichihashi, *et al.*, 2009).



Gambar 4. Skema Proses Patofisiologis Setelah Terpapar Sinar Matahari
Sumber: Yin, R. *et al.*, 2015.

SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Flavan-3-ol merupakan senyawa fenolik yang terdapat pada tanaman coklat (*Theobroma cacao L.*) yang memiliki fungsi *anti aging* pada kulit. Secara histologis, matriks ekstraseluler kulit intrinsik yang mengalami penuaan memiliki penurunan elastin. Elastin memberikan elastisitas alami dan kekuatan untuk tubuh manusia. Elastin juga memainkan peran dalam perbaikan jaringan.

Dasar dan unit molekul utama yang terlibat dalam perkembangan kulit manusia adalah kolagen yang dihasilkan dari prokolagen (Gambar 3). Kolagen adalah protein yang terdapat di dalam jaringan ikat tubuh manusia. Fibroblas dermal menghasilkan prokolagen di bawah pengaruh perubahan TGF- β dan AP-1 dimana TGF- β dan AP-1 masing-masing mengatur produksi dan kerusakan kolagen. Akibat paparan sinar UV yang diterima dari sinar matahari, mengakibatkan peningkatan regulasi enzim matriks metaloproteinase (MMP) yang disekresi oleh keratinosit, fibroblas, dan sel-sel lain menyebabkan kerusakan kolagen oleh AP-1 serta terjadinya penurunan sintesis kolagen.

Flavan-3-ol sebagai senyawa *anti aging* pada kulit, diketahui memiliki beberapa kandidat protein target yang berperan penting dalam pembentukan *aging* salah satunya yaitu MMP3. MMP3/Stromelysin-1 mendegradasi fibronectin, laminin, gelatin tipe I, II, IV, dan V; kolagen III, IV, X dan IX, dan *cartilage proteoglycans* dan mengaktifkan *procollagenase*. Hal ini mengakibatkan kerusakan pada jaringan ikat selama *photoaging* yang berpengaruh dalam pembentukan keriput pada kulit. Penelitian *in silico* ini dapat diuji dengan penelitian di laboratorium (baik secara *in vivo* maupun *in vitro*) disertai pengkajian literatur yang lebih luas untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Borlon, C., Geoffroy, W., Patrice, G., Florence, D-C, Pierre L., Christophe, D., Olivier, T. (2008). Expression profiling of senescent-associated genes in human dermis from young and old donors. Proof-of-concept study. *Biogerontology*.
- Ichihashi, M., Hideya, A., Mashaki, Y., Yoko, N., Mary, M. (2009). Photoaging of the skin. *Anti Aging Medicine Journal*, 6(6): 46-59.
- Kim, S.R., Yu, R.J., Dae, H.K., Eun, J.J., Yeon, J.C., Kyoung, M.M., Min, H.P., Chan, H.P., Ki, W.C. Ha, R.B., Yung, W.C., Nam, D.K., Hae, Y.C. (2013). Anti-Wrinkle and Anti-Inflammatory Effects of Active Garlic Components and the Inhibition of MMPs via NF- κ B Signaling.
- Osakabe, N. (2013). Flavan-3-ols improve metabolic syndrome risk factors: evidence and mechanisms. *Journal Clinic Biochemistry Nutrition*, 52(3): 186-192.
- Pangastuti, A. Ihya, F.A., Ahya, Z.A., Mohammad, A. (2015). Natural Bioactive Compound From Moringa Oleifera-against Cancer Based On In Silico Screening. *Jurnal Teknologi*. 78 (5): 315-318.
- Pubchem. (2016). <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3707243#section=3D-Conformer>.
- Şentürk, T. (2015). The Mysterious Light of Dark Chocolate. *Turkish Society of Cardiology*, 43 (2): 199-207.

- Shim, J.S. Yi-Y.K., Jae, K.H. (2008). The Effects of Panduratin A Isolated from *Kaempferia pandurata* Roxb on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 and Type-1 Procollagen in Human Skin Fibroblasts. *Planta Medica. Volume 74*, 239-244.
- Scapgnini, G., Sergio D., Laura D.R., Antonio D.L., Hector H.O., Giuseppe M., Arrigo F.C. dan Salvador G. (2014). Cocoa Bioactive Compounds: Significance and Potential for the Maintenance of Skin Health. *Journal of Nutrient*, 6: 3202-3213.
- STRING Consortium. (2016). <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=bM9N7vI3yEan>.
- Uniprot Consortium. (2016). <http://www.uniprot.org/uniprot/P08254>.
- Wahab, N.A., Russiy A.R., Amin I., Shuhaimi M., dan Puziah H. (2014). Assessment of Antioxidant Capacity, Anti-collagenase and Anti-elastase Assays of Malaysian Unfermented Cocoa Bean for Cosmetic Application. *Natural Products Chemistry Research*, 2:3.
- Yin, R., Q Chen and M R Hamblin. (2015). *Skin Photoaging* chapter 1. doi:10.1088/978-1-6270-5455-3ch1.
- Yoon, H-S., Jong R.K., Gyeong Y.P., Jong-Eun K., Dong H.L., Ki W.L., dan Jin H.C. (2016). Cocoa Flavanol Supplementation Influences Skin Conditions of Photo-Aged Women: A 24-Week Double-Blind, Randomized, Controlled Trial¹⁻³. *The Journal of nutrition and Disease*, 146: 46-50.