

ANALISIS IN SILICO SENYAWA HIBISCETIN KOMBUCHA ROSELLA SEBAGAI IMUNOMODULATOR SEL IMUNOKOMPETEN PADA PENYAKIT MALARIA

Nurhaida Widiani¹
Ovi Prasetya Winandari²
Marlina Kamelia³
Puji Nurrohmah⁴

^{1,2,3,4} Pendidikan Biologi, UIN Raden Intan Lampung

E-mail:¹nurhaidawidiani@radenintan.ac.id, ²oviprasetyawinandari@radenintan.ac.id,
³marlinakamelia@radenintan.ac.id, ⁴Pujinurrohmah290398@gmail.com

Abstract: Malaria is one of the public health problems in Indonesia. The data show that drug resistance is found in malaria control. For this reason, various efforts are needed to find solutions to overcome these problems. The presence of the flavonoid compound hibiscetin in Kombucha Rosella is thought to act as an immunomodulator that can increase the activity and proliferation of lymphocyte cells during malaria infection. Kombucha Rosella is considered to be a supportive therapy for malaria treatment. The purpose of this study was to obtain a scientific basis for the use of Kombucha Rosella tea as immunotherapy for malaria. The method used is by using An silico docking simulation. The ligand compound used was hibiscetin and the target protein was TCR – MHC II complex. Docking simulation using AutodockTools 1.5.6, Autodock 4.2, and Discovery Studio Visualizer applications. The results showed that the Hibiscetin compound had the potential to increase the activity of immunocompetent cells in silico with the value of Free Energy Binding ($\Delta G_{binding}$) -3.08, the value of the inhibition constant was 5.49 nM, and the RMSD value <5 was 3.32.

Kata Kunci : Immunomodulator, In Silico, Kombucha Rosella, Sel Imunokompeten

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit tular vektor yang disebabkan oleh protozoa. Jumlah kasus malaria berdasarkan data WHO diperkirakan 300 – 500 juta/tahun dengan angka kematian lebih dari 1 juta (Liwana, 2015). Berdasarkan data WHO (2010), malaria dapat menyebabkan anemia dan menurunkan produktivitas kerja, bahkan dapat menyebabkan kematian pada kelompok resiko tinggi (bayi, balita, dan ibu hamil). Selama 5 tahun terakhir malaria menjadi penyebab kematian anak di dunia. Lebih dari 200 ribu kasus kematian pada anak di Afrika disebabkan oleh malaria *falciparum* sedangkan malaria *vivax* menjadi penyebab anemia dan kematian

pada anak di Asia dan Oceania (Ashley dan Jeanne, 2020).

Di Indonesia malaria masih dianggap ancaman kesehatan masyarakat. Salah satu provinsi yang merupakan daerah endemis malaria adalah Lampung. Selama tahun 2010 – 2017 persentase kasus malaria di Lampung yang terkonfirmasi dengan laboratorium dan diobati dengan ACT cenderung meningkat (Dinkes, 2017). Malaria disebabkan oleh 5 spesies *Plasmodium* yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. knowlesi*, tetapi kasus malaria di Indonesia yang disebabkan *P. knowlesi* belum banyak dilaporkan (Kemenkes, 2017). Vektor penyakit ini adalah nyamuk *Anopheles*

betina. Lebih dari 20 spesies *Anopheles* yang merupakan vektor dari empat spesies *Plasmodium* ditemukan di Indonesia (Elyazar *et al*, 2011). Bahkan berdasarkan data Dinas Kesehatan Provinsi Lampung, sebanyak 10 spesies *Anopheles* yang menjadi vektor malaria ditemukan di Lampung. Spesies tersebut yaitu *An. sundaicus*, *An. vagus*, *An. acconitus*, *An. barbirotris*, *An. subpictus*, *An. indefinitus*, *An. kochi*, *An. minimus*, *An. tessellatus*, dan *An. maculatus* (Dinkes, 2017).

Dalam rangka pengendalian penyakit malaria di Indonesia, monitoring dan evaluasi perlu terus dilakukan, serta perlu adanya formulasi kebijakan dan strategi yang tepat. Pemerintah menargetkan Indonesia bebas malaria tahun 2030. Untuk tahun 2020 sebanyak 23 kabupaten/kota masuk kriteria endemis tinggi, 21 kabupaten/kota masuk kriteria endemis sedang, dan 152 kabupaten/kota masuk kriteria endemis rendah. Provinsi yang mencapai 100% eliminasi malaria, adalah DKI Jakarta, Jawa Timur, dan Bali. Sedangkan provinsi yang belum mencapai eliminasi adalah Maluku, Papua, dan Papua Barat (Biro Komunikasi dan Pelayanan Masyarakat Kementerian Kesehatan RI, 2021).

Penurunan efikasi beberapa obat antimalaria menjadi tantangan terbesar dalam pengendalian malaria. Di Indonesia sudah sejak lama resistensi terhadap Klorokuin dan Sulfadoksin terjadi pada *P. falciparum*, *P. vivax*, dan *P. malariae* (Elyazar *et al*, 2011). Saat ini pengobatan malaria yang dianjurkan di Indonesia dengan menggunakan ACT (*Artemisinin-based Combination Therapy*). Mutasi genetik yang terjadi pada *Plasmodium* dapat menyebabkan munculnya strain *Plasmodium* yang tahan terhadap obat

antimalaria (Yusuf, 2014). Berdasarkan kemampuan *Plasmodium* tersebut kemungkinan munculnya strain baru yang resisten terhadap artemisin bisa saja terjadi.

Menghadapai hal tersebut perlu dipikirkan alternatif terapi pendamping diantaranya melalui usaha peningkatan imun tubuh dengan konsumsi bahan-bahan alami. Kelopak bunga Rosella dapat diolah menjadi minuman herbal yaitu Kombucha Rosella. Berdasarkan penelitian diketahui aktivitas imunomodulator terhadap proliferasi sel limfosit mencit secara *in vitro* tertinggi yaitu dengan pemberian teh Kombucha Rosella yang difermentasi selama 10 hari. Hal ini diduga karena adanya kandungan asam organik (Ulfah *et al*, 2016). Selain itu Rosella juga diketahui kaya akan antioksidan diantaranya flavonoid seperti *hibiscetin*, *gossypetin* dan *quercetin*. Berdasarkan penelitian diketahui senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan sebagai kandidat obat antimalaria karena dapat menghambat perkembangan plasmeprin I dan plasmeprin II (Nerdy, 2017). Selain itu pemanfaatan herbal seperti *Kombucha Rosella* diprediksi dapat digunakan untuk meningkatkan sistem imun tubuh.

Salah satu upaya dalam penemuan obat adalah dengan memanfaatkan teknologi komputerisasi dengan metode *in silico*. *In silico* dengan *molecular docking* mampu memprediksi ikatan terkuat antara senyawa bioaktif dan protein target. Penggunaan metode *in silico*, dapat digunakan untuk memprediksi penelitian lanjutan secara *in vitro* atau *in vivo*. Penelitian Malau dan Fatimah (2019) secara *in silico* diketahui bahwa senyawa ligan Cyanidin 3,5-di-(6-malonilglucoside) memiliki kestabilan yang kuat terhadap enzim *Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

dari *P. falciparum*.

Berdasarkan aktivitas imunomodulator yang dimiliki teh Kombucha Rosella, maka ingin diketahui apakah teh Kombucha Rosella juga dapat meningkatkan aktivitas sel imunokompeten yang berperan dalam imunitas terhadap infeksi penyakit malaria melalui simulasi *in silico* docking. Senyawa flavonoid hibiscetin digunakan sebagai ligan. Sedangkan Protein TCR $\alpha\beta$ - MHC II complex digunakan sebagai protein target. Hal ini perlu dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan landasan ilmiah penggunaan teh Kombucha Rosella sebagai imunoterapi untuk penyakit malaria.

METODE

Uji aktivitas sel imunokompeten dilakukan dengan metode *In Silico*, secara komputasi. Untuk melakukan proses docking molekuler digunakan perangkat keras laptop HP 14-b50xx dengan spesifikasi RAM 4096 MB. Simulasi docking dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Autodock tools 1.5.6*, *Autodock 4* dan *Discovery Studio Visualizer 2020*. Ligand berupa hibiscetin diunduh dari laman PubChem (<http://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan kode PubChem: 15559735. Protein target struktur kristal enzim TCR $\alpha\beta$ - MHC II Complex diunduh dari Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) dengan kode PDB: 4GRL.

Proses docking menggunakan perangkat lunak *Autodock Tools 1.5.6* dilakukan untuk memperoleh data berupa nilai *Binding Energy*, nilai konstanta inhibisi dan nilai RMSD. Selain itu juga dilakukan proses docking menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* untuk mendapatkan data berupa gambar yang

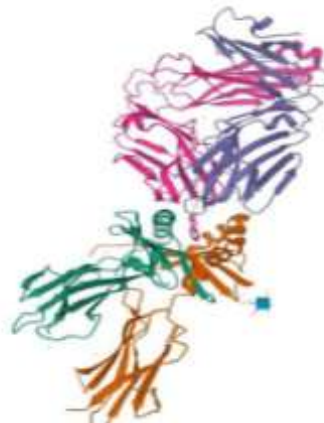
dapat memvisualisasikan ikatan hidrogen serta interaksi ligan dan protein target.

HASIL

Minuman herbal yang berasal dari fermentasi kelopak rosella, jamur dan bakteri yeast sering dikenal sebagai kombucha rosella (Achmad dkk, 2016). Hasil fermentasi tersebut mengandung banyak senyawa kimia, salah satunya adalah hibiscetin. Penelitian ini menggunakan senyawa hibiscetin sebagai ligan yang digunakan sebagai imunomodulator penyakit malaria.

Efektivitas minuman kombucha rosella sebagai pendamping obat antimalaria dapat dilihat dengan metode docking *in silico*. Tahap penyiapan struktur makromolekul diunduh dari PDB dengan alamat berikut <http://www.rscb.org.pdb>.

Struktur makromolekul yang telah didapat masih dalam bentuk terikat dengan ligan dan molekul air. Pemisahan residu non standar menggunakan program *Discovery Studio 3.5 Visualizer*.



Gambar 1. Struktur T Cell reseptor. Tosca : rantai A; Coklat : rantai B; Ungu : rantai C; Pink : rantai D; Biru: ligan; Bintik: molekulair.

Hibiscetin (kode PubChem CID: 15559735) diunduh melalui (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Hibiscetin dibuat dua dimensi (2D) kemudian tiga dimensi (3D). Ikatan antar ligan dan makromolekul diprediksi melalui binding energi dari hasil docking. Binding energi merupakan kekuatan interaksi antar molekul. Nilai binding energi yang

semakin tinggi, mempengaruhi afinitas reseptor dan ligan menjadi semakin rendah. Interaksi ligan dan protein terjadi jika strukturnya menghasilkan memiliki nilai ikatan yang makin kecil, sehingga ikatannya semakin stabil. Ligan uji yang digunakan yaitu hibiscetin. Berikut tabel hasil uji antara reseptor 4GRL dengan hibiscetin.


Tabel 1. Rantai Penyusun T Reseptor

Molecule	Chains	Sequence length	Organism	Details
MHC class II HLA-DQ-alpha chain	A	183	<i>Homo sapiens</i>	Mutation(s):0
MHC class II antigen	B	200	<i>Homo sapiens</i>	Mutation(s):0
TCR Hy.1B11 alpha chain	C	209	<i>Homo sapiens</i>	Mutation(s):0
TCR Hy.1B11 beta chain	D	268	<i>Homo sapiens</i>	Mutation(s):0

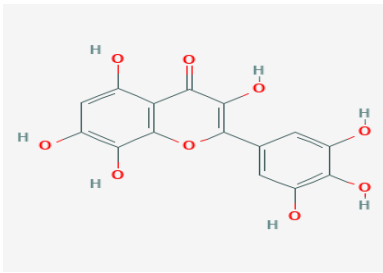
Hasil analisis docking dapat dilihat dari nilai RMSD yang berguna untuk mengetahui apakah kedekatan antara ligan alami dengan ligan uji. Ikatan ligan semakin banyak dengan reseptor maka jarak antar ikatan semakin dekat dan semakin kuat.

RMSD merupakan parameter yang digunakan untuk mengevaluasi parameter keberhasilan proses docking dan perubahan konformasinya.

Tabel 2. Ligan Alami T Cell Reseptor

ID	Chains	Name/Formula/InChI key	2D diagram
NAG	B	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE EC ₃ H ₁₅ N O ₆ OVRNDRQM DRJTHS-FMDGEEDCSA-N	

Tabel 3. Data Hibiscetin dan strukturnya

PubChemCID	15559735
Molecular Formula	C ₁₅ H ₁₀ O ₉
Synonyms	Hibiscetin 577-24-2 SCHEMBL12640014CTK8J42 76LMPK12113272 3,5,7,8,3'',4'',5''-heptahydroxyflavone
Molecular Weight	334.23g/mol
Struktur	2D  3D

Hasil docking dikatakan valid apabila nilai RMSD kurang atau sama dengan 2 artinya ligan mampu melakukan penyesuaian struktur demi mencapai konformasi yang stabil saat berikat dengan sisi aktif reseptor.

Berdasarkan analisis hasil docking (Tabel 4),

terlihat bahwa hibiscetin berpotensi untuk berikatan dengan reseptor TCR $\alpha\beta$ – MHC II complex secara *in silico*. Hal ini dapat diasumsikan bahwa hibiscetin ini berpotensi dalam meningkatkan aktivitas sel imunokompeten secara *in silico*, dengan cara meningkatkan aktivitas dan proliferasi sel limfosit (Hidayanti dkk, 2014).

Tabel 4. Skor Docking Ligan Uji Hibiscetin

Ligan	Interaksi esidu	Binding energy (kcal/mol)	Konstanta inhibisi (mM)	Cluster RMSD	Reference RMSD
-------	-----------------	---------------------------	-------------------------	--------------	----------------

Hibiscetin	ARG B:149ASP A:110LEUB :147 THRA:90	-3.08	5.49	0.00	3.32
------------	---	-------	------	------	------

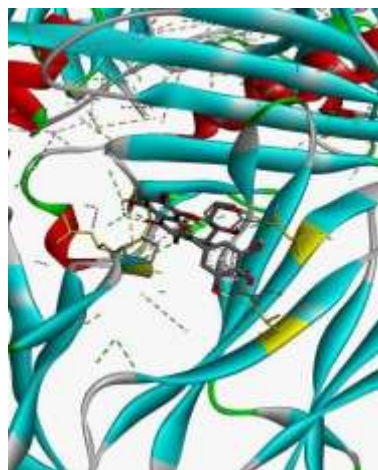
PEMBAHASAN

Free Energy Binding ($\Delta G_{binding}$) pada ligan uji bernilai -3.08 sedangkan konstanta inhibisinya sebesar 5.49 nM. Nilai RMSD yang dihasilkan pada uji ini kurang dari 5 yaitu 3.32 Å. Hibiscetin memiliki nilai RMSD lebih besar dibandingkan ligan alami. Hal ini disebabkan oleh proses pencarian konformasi dari ligan untuk dapat berikatan dengan tepat ke reseptor TCR $\alpha\beta$ – MHC II complex.

Antara ligan uji dan protein terbentuk 7 ikatan rantai hidrogen pada rantai B dan A yaitu LEU A:108, ASPA:110, THRA:90, PROB:146, ARGB:149, PHEA:146, dan LEUB:147 (Gambar 2).

Apabila jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk semakin banyak maka interaksi antara ligan uji dengan reseptornya akan semakin kuat. Ligan hibiscetin dalam penelitian ini menunjukkan kemampuannya untuk digunakan sebagai inhibitor protein reseptor karena jumlah ikatan hidrogennya dapat menstabilkan ikatan yang dihasilkan tersebut.

Ikatan Van Der Waals, π -Donor Hydrogen Bond, Conventional Hydrogen Bond, dan π Alkyl adalah ikatan selain ikatan hidrogen terbentuk setelah divisualisasi. Ikatan tersebut terjadi akibat interaksi ligan dan protein reseptor sehingga meningkatkan afinitasnya.



Gambar 2. Ikatan-ikatan yang terbentuk diantara Hibiscetin

Interaksi yang terjadi antara ligan dengan protein reseptor dipengaruhi oleh hasil docking binding energi serta

konstanta inhibisinya. Apabila binding energinya semakin kecil maka energi yang dibutuhkan semakin

sedikit dan kemampuan senyawa uji dalam menghambat reseptor akan semakin besar. Analisis docking yang terjadi antara hibiscetin dengan protein reseptor menunjukkan hasil sebesar -3.08 kcal/mol.

Limfosit umumnya akan berproliferasi ketika terjadi pengikatan antigen ke reseptor di permukaan sel T bersamaan dengan interleukin-1 (IL-1) yang berasal dari *Antigen Presenting Cell* (APC) sehingga protein G dapat teraktivasi. Protein G kemudian

akan mengaktifkan zimfosfolipase C yang akan mengubah substrat fosfatidilinositol bifosfat (PIP_2) menjadi produk berupa diasilgliserol (DAG) dan trifosfat inositol (IP_3). Proses ini berlangsung di membran plasma (Dewa dkk, 2014). IP_3 selanjutnya akan berdifusi ke sitosol lalu berikatan dengan protein reseptor *calcium-sequestering compartment* di permukaan sitoplasmik.

Proses pengikatan tersebut akan mengakibatkan peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} sitosol. Konsentrasi ion Ca^{2+} dan DAG akan menyebabkan protein kinase C menjadi aktif. Protein kinase C yang teraktivasi selanjutnya akan memfosforilasi fosfat kresiduserin atau pun treonin yang spesifik pada protein membran sehingga memicu pertukaran Na^+ , selain itu ion H^+ akan menurun sehingga terjadi peningkatan pH. Derajat keasaman (pH) yang meningkat akan menjadikan sinyal bagi sel untuk berproliferasi. Protein kinase C yang teraktivasi akan memicu produksi interleukin-2 (IL-2) sehingga sel B maupun sel T akan aktif berproliferasi (Ulfah dkk, 2016).

Sel limfosit yang teraktivasi dan berproliferasi akibat dipicu

senyawa hibiscetin kombucha rosella, mekanisme penyama dengan mekanisme proliferasi pada umumnya. Antigen yang nantinya dikenali reseptor sel T maupun sel B akan diperankan oleh hibiscetin kombucha rosella akan memicu respon imun. Hasil penelitian ini menunjukkan antigen dengan sel T naif pengenalannya melalui adanya reseptornya $TCR\alpha\beta$. $TCR\alpha\beta$ terletak pada permukaan sel Limfosit T naif dalam mengenali antigen membutuhkan bantuan dari APC. Antigen akan dipresentasikan MHC II yang merupakan molekul pada permukaan sel APC (Sel dendritik) sehingga terjadi aktivasi dan proliferasi sel Limfosit T (Baratawidjaja & Rengganis, 1991).

Pada penelitian yang telah dilakukan pengikatan molekul ke protein target $TCR\alpha\beta$ -MHC II complex. Limfosit T naif yang telah matang akan meninggalkan timus sehingga teraktivasi dan mengalami proliferasi apabila terpapar antigen yang dipresentasikan oleh MHC II. Pada penelitian ini yang bertindak sebagai antigen adalah senyawa hibiscetin kombucha rosella. Sel T naif kemudian berdiferensiasi menjadi sel Th0 (Ulfah dkk, 2016).

Adanya pembawa pesan kedua (diasilgliserol) serta peningkatan konsentrasi Ca^{2+} dalam sitosol yang terjadi ketika aktivasi dan proliferasi sel limfosit akan menyebabkan sel Th0 terpacu untuk memproduksi serta mensekresikan sitokin IL-2. IL-2 yang dihasilkan menyebabkan sel T, sel B dan sel NK akan berproliferasi dan diferensiasi (Baratawidjaja, 1991).

Apabila sel darah merah terinfeksi *Plasmodium* maka sel Th0 dari sel tersebut akan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Kondisi tersebut akan mengaktifkan makrofag yang dipicu sitokin jenis IFN- γ hasil sekresi sel Th1, ini terjadi pada fase efektor (Baratawidjaja & Rengganis, 1991).

Bentuk respon imun seluler yang terjadi yaitu makrofag teraktivasi akan memfagosit *Plasmodium* pada stadium eritrositer. Pada jalur Th2 akan diproduksi sitokin IL-4 dan IL-5 yang akan disekresikan untuk membantu sel berdiferensiasi menjadi sel plasma. Sel plasma akan menimbulkan respon yang spesifik berupa sekresi antibodi untuk menghancurkan *Plasmodium* pada stadium eksoeritrositer serta stadium eritrositer. Pada tahap respon imun humoral ini juga sel memori akan dihasilkan agar dapat mengenali *Plasmodium* lebih cepat apabila infeksi kembali menyerang tubuh (Baratawidjaja & Rengganis, 1991).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa hibiscetin kombucha rosella berpotensi untuk berikatan dengan TCR Alpha-beta. Dengan demikian Hibiscetin berpotensi untuk meningkatkan aktivitas sel imunokompeten secara *in silico*.

DAFTAR RUJUKAN

Hafid, A. F., N. Puliansari, N. S. Lestari, L. Tumewu, A. Rahman, dan A. Widyawaruyanti. 2016. Skrining Aktivitas Antimalaria Beberapa Tanaman Indonesia Hasil Eksplorasi Dari Hutan Raya Cagar, Batu-

Malang, Jawa Timur. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia* 3,1: 6–10.

Ashley, E. A. & J. R. Poespoprodjo. 2020. Treatment and prevention of malaria in children. *Lancet Child Adolesc Health* 4: 775 - 789

Baratawidjaja, K. G & Rengganis, I. 1991. *Imunologi Dasar*. Universitas Indonesia: Jakarta.

Anandagiri, D. A. W. M., I. B. P. Manuaba, & N. G. A. M. D. Suastuti. 2014. Pemanfaatan Teh Kombucha Sebagai Obat Hiperurisemia Melalui Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase pada *Rattus Norvegicus*. *Jurnal Kimia* 8, no. 2: 220–225

Dinkes. 2017. Profil Kesehatan Provinsi Lampung Tahun 2017. Dinkes PemProv Lampung.

Kemkes. 2017. Buku Saku Tatalaksana Kasus Malaria. Kemkes RI.

Elyazar, I. R. F., S. I. Hay, J. K. Baird. 2011. Malaria Distribution, Prevalence, Drug Resistance and Control in Indonesia. *Advance in Parasitology* 74: 42.

Hidayanti, M. D., S. Astuti, dan M. E. Kustiyawati. 2014. Pengaruh Pemberian Kombucha Teh Rosella Terhadap Profil Darah Mencit (*Mus Musculus L.*). *Jurnal Agritech* 34, no. 4: 382–89.

Liwan. 2015. Diagnosis dan Penatalaksanaan Malaria Tanpa Komplikasi pada Anak. *Cermin Dunia Kedokteran* 42, 6: 425 – 429.

Malau dan Fatimah. 2019. Analisa Docking Cyanidin 3,5-di-(6-

- malonylglucoside) terhadap Reseptor Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR) sebagai Anti Malaria. *J. EduMatSains* 4, 1: 99-110.
- Nerdy. 2017. In Silico Docking Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) Calyces Flavonoids as Antimalarial against Plasmeysin 1 and Plasmeysin 2. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(10):183
- Ulfah, M., Octaviani, D.P., dan Sasmito, E. 2016. Uji aktivitas Imunomodulator Fermentasi Teh Rosela Jamur Kombucha Terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Galur Balb/c Secara Invitro. *Jurnal Ilmiah Fakultas Farmasi*. Unwahas: Semarang.
- World Health Organization. 2010. *World Malaria Report 2010*. hal.32-33.
- Yusuf. 2015. Anti-Malarial Drug Resistance. *Majalah Kedokteran Andalas* 37, 1: 64 – 69.