

**PROTEOME ANALYSIS, IN VITRO AND IN SILICO STUDIES OF
ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER PEPTIDES FROM THE
PROTEIN HYDROLYSATE FROM EQUATORIAL SPITTING COBRA
(*Naja sumatrana*) VENOM**

ABSTRACT

Naseer Ahmed

19/451538/SPA/00718

Bioactive peptides play an important role in developing novel medicine to overcome the resistance of conventional antibacterial and anticancer drugs. The goals of this study include proteome analysis, bioactivity testing of *Naja sumatrana* venom, identification of bioactive peptides as well as confirmation of the actions of potential antibacterial and anticancer peptides.

N. sumatrana venom protein was hydrolyzed with trypsin for proteome analysis. For preparative purposes, tryptic digestion was performed with and without alkylation and reducing pre-treatment before the hydrolysis. The hydrolysate was fractionated by using reversed-phase solid-phase extraction (RP-SPE) for anticancer activity, and cation exchange column chromatography for antibacterial activity. The fractions were tested for antibacterial activity using the Disc diffusion against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and MTT assay for anticancer activity against MCF-7 cell line. The peptides that present in the most active fractions for both activities, identified using high-resolution mass spectrometry (HRMS). The identified peptides for anticancer docked against the EGFR receptor, and the antibacterial peptides were docked against DNA Gyrase subunit b, using autodock vina.

Proteome analysis reveals 14 proteins present in the venom mostly categorized as toxin proteins. The tryptic hydrolysis of venom protein with pre-treatment is successful to hydrolyze up to 61.29% while hydrolysis without alkylation and reduction can only result in a 46.14% degree of hydrolysis. Cation exchange pH 6.0 fraction from both protein hydrolysates are the most active as antibacterial against *Escherichia coli* with MIC values are 3.37 µg/mL and 1.58 µg/mL respectively. The fractions of pH 3.0 resulting from pre-treated protein hydrolysate as well as the fraction of pH 7.0 of hydrolysis without alkylation and reduction treatment are the most active fraction against *Staphylococcus aureus* with MIC value 2.45 µg/mL, 1.09 µg/mL, respectively. Among identified peptides in those fractions, the peptide with the amino acid sequence of TQFSDR, VYGGDSR, YTPTNK, and TFQDSR shows a high-affinity score, good RMSD value, and best-fit model against DNA gyrase and dihydrofolate reductase from both *E. coli* and *S. aureus*. The 75% methanol fraction of RP-SPE shows anticancer activity against the MCF-7 cell line with a selectivity index of 5.0 to the normal Vero cell line. Based on the molecular docking to the EGFR receptor, identified peptides with amino sequences of NSLLVK, SLLLVK, and TVPVKR could be responsible to the anticancer activity based on high-affinity score, and good RMSD value.

Keywords: bioactive peptides, hydrolysis, venom, *N. sumatrana*, *in silico* study

ANALISIS PROTEOM, STUDI IN VITRO DAN IN SILICO PEPTIDA ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER DARI PROTEIN HIDROLISAT VENOM KOBRA SUMATRA (*Naja sumatrana*)

Naseer Ahmed

19/451538/SPA/00718

INTISARI

Peptida bioaktif memainkan peran penting dalam mengembangkan pengobatan baru untuk mengatasi resistensi obat konvensional antibakteri dan antikanker. Tujuan dari penelitian ini meliputi analisis proteom, pengujian bioaktivitas venom *Naja sumatrana*, identifikasi peptida bioaktif serta konfirmasi aksi peptida antibakteri dan antikanker potensial.

Protein venom *N. sumatrana* dihidrolisis dengan tripsin untuk analisis proteom. Untuk tujuan preparatif, pencernaan tryptic dilakukan dengan dan tanpa alkilasi dan pengurangan pra-perlakuan sebelum hidrolisis. Hidrolisat difraksinasi menggunakan ekstraksi fase padat fase terbalik (RP-SPE) untuk aktivitas antikanker, dan kromatografi kolom penukar kation untuk aktivitas antibakteri. Fraksi diuji aktivitas antibakteri menggunakan difusi disc terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, dan uji MTT untuk aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7. Peptida yang hadir dalam fraksi paling aktif untuk kedua aktivitas diidentifikasi menggunakan spektrometri massa resolusi tinggi (HRMS). Peptida yang teridentifikasi untuk antikanker dipasangkan pada reseptor EGFR, dan peptida antibakteri dipasangkan pada DNA Gyrase subunit b, menggunakan AutoDockVina.

Analisis protein mengungkapkan 14 protein yang ada dalam venom yang sebagian besar dikategorikan sebagai protein toksin. Hidrolisis tryptic protein venom dengan pre-treatment berhasil menghidrolisis hingga 61,29% sedangkan hidrolisis tanpa alkilasi dan reduksi hanya dapat menghasilkan derajat hidrolisis 46,14%. Fraksi penukar kation pH 6,0 dari kedua protein hidrolisat tersebut paling aktif sebagai antibakteri terhadap *E. coli* dengan nilai KHM masing-masing 3,37 µg/mL dan 1,58 µg/mL. Fraksi pH 3,0 hasil hidrolisat protein pre-treatment serta fraksi hidrolisis pH 7,0 tanpa alkilasi dan perlakuan reduksi merupakan fraksi paling aktif terhadap *S. aureus* dengan nilai KHM masing-masing 2,45 µg/mL, 1,09 µg/mL. Di antara peptida yang teridentifikasi dalam fraksi tersebut, peptida dengan urutan asam amino TQFSDR, VYGGDSR, YTPTNK, dan TFQDSR menunjukkan skor afinitas tinggi, nilai RMSD yang baik, dan model paling cocok terhadap DNA girase dan reduktase dihidrofolat dari kedua *E. coli* dan *S. aureus*. Fraksi metanol 75% RP-SPE menunjukkan aktivitas antikanker terhadap cell line MCF-7 dengan indeks selektivitas 5,0 terhadap cell line Vero normal. Berdasarkan molekul docking ke reseptor EGFR, peptida yang teridentifikasi dengan urutan amino NSLLVK, SSLLVK, dan TVPVKR dapat bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker berdasarkan skor afinitas tinggi, dan nilai RMSD yang baik.

Kata kunci: peptida bioaktif, hidrolisis, venom, *N. sumatrana*, studi *in silico*