

ANALISIS IN SILICO ANDROGRAFOLID, NEOANDROGRAFOLID DAN DEOXY ANDROGRAFOLID PADA PROTEIN KINASE C (PKC)- β II SEBAGAI ANTI ATEROSKLEROSIS

Putu Yudha Ugrasena¹, Ni Kade Dewi Diantari², Dyah Ratna Ayu Puspitasari²

¹Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bali Wisnu Dharma Denpasar
Jalan Kebo Iwa 1-2, Denpasar, Bali

² Program Studi D3 Farmasi, Akademi Kesehatan Bintang Persada
Jalan Gatot Subroto Barat 144 A, Denpasar, Bali

e-mail: e-mail: ugrasenayudha@gmail.com¹

Received : September, 2022	Accepted : Oktober, 2022	Published : Oktober, 2022
----------------------------	--------------------------	---------------------------

Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory process of lipid accumulation in the tunica intima of arteries. High concentrations of LDL in the blood cause modification of oxidation. Protein kinase C- β II has a role in LDL absorption. Andrographis paniculata with major compounds of andrographolide, neoandrographolide and deoxyandrographolide has various pharmacological activities, such as anti-atherosclerosis. The purpose of this study was to determine the binding energy of andrographolide, neoandrographolide and deoxy-andrographolide which have the potential as anti-atherosclerosis in protein kinase C (PKC)- β II with the in silico method. The research is in-silico exploratory towards the target protein was protein kinase C (PKC)- β II (PDB ID : 2i0e), protein preparation, validation of molecular docking methods to docking of andrographolide, neoandrographolide and deoxy-andrographolide compounds on protein. The three compounds had affinity for the target protein with a binding energy value of -9.99 with neoandrographolide, -8.84 with andrographolide, -9.05 with neoandrographolide. The docking results show that andrographolide, neoandrographolide, and deoxy-andrographolide have activity anti-atherosclerosis in silico through inhibition of protein kinase C (PKC)- β II. Andrographolide, neoandrographolide and deoxy-andrographolide have potential as anti-atherosclerosis through inhibition of protein kinase C (PKC)- β II.

Keywords: andrographolide, neoandrographolide, deoxy-andrographolide, PKC- β II, *molecular docking*
(keywords written in small characters except abbreviation, 3-6 words, separated by commas, Calibri, 10, Italic)

Abstrak

Aterosklerosis adalah proses inflamasi kronis akumulasi lipid pada tunika intima pembuluh arteri. Konsentrasi LDL dalam darah yang tinggi menyebabkan modifikasi oksidasi. Protein kinase C- β II memiliki peran terhadap penyerapan LDL. Sambiloto dengan senyawa mayor andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid memiliki berbagai aktivitas farmakologi salah satunya sebagai anti terosklerosis. Tujuan penelitian ini adalah Untuk mengetahui energi ikatan dan perbandingan ikatan andrografolid, neoandrografolid dan deoxy-andrografolid yang berpotensi sebagai anti aterosklerosis pada protein kinase C (PKC)- β II dengan metode in silico. Jenis penelitian ini yaitu eksploratif secara in-silico terhadap protein target yaitu protein kinase C (PKC)- β II (PDB ID : 2i0e) proses preparasi senyawa, preparasi protein, validasi metode molecular docking hingga docking senyawa andrografolid, neoandrografolid dan deoksi-andrografolid pada protein target. Ketiga senyawa uji memiliki afinitas pada protein target dengan nilai energi ikatan -9,99 dengan neoandrografolid, -8,84 dengan

andrografolid, -9,05 dengan neoandrografolid. Pada hasil *docking*, dapat diketahui bahwa andrografolid, neoandrografolid, dan deoksi-andrografolid memiliki aktivitas anti aterosklerosis secara *in silico* melalui penghambatan protein kinase C (PKC)- β II. Dari ketiga senyawa uji yaitu andrografolid, neoandrografolid dan deoksi-andrografolid berpotensi sebagai anti arterosklerosis melalui penghambatan protein kinase C (PKC)- β II.

Kata Kunci: *andrografolid, neoandrografolid, deoksi-andrografolid, PKC- β II, molecular docking*

1. PENDAHULUAN

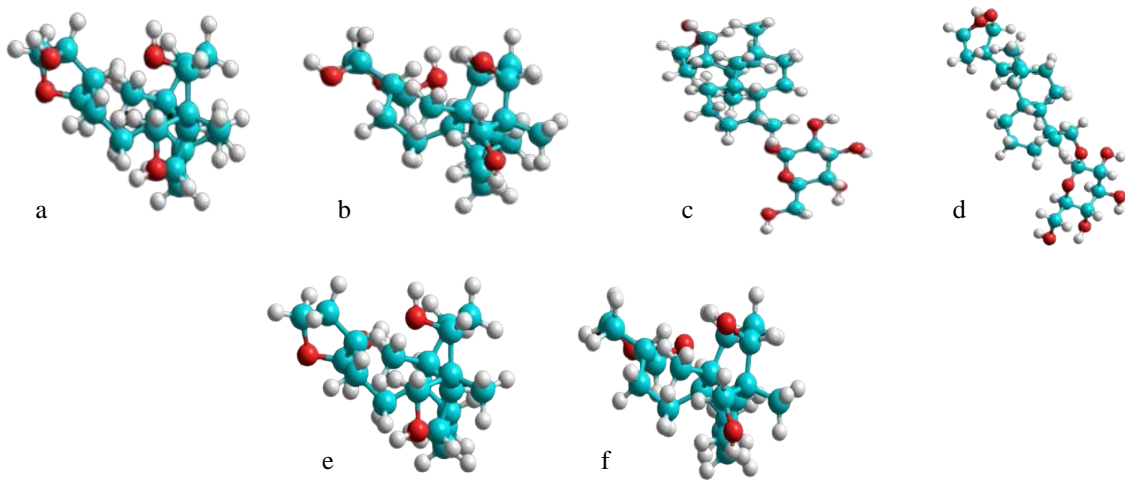
Aterosklerosis memiliki peran penting pada penyakit kardiovaskuler terutama Penyakit Jantung Koroner (Maulida et al., 2018). Aterosklerosis ditandai dengan adanya perubahan dinding arteri yang disebabkan oleh adanya akumulasi lipid ekstra sel, rekrutmen dan migrasi monosit, pembentukan sel busa, serta deposit matriks ekstraseluler (Hamidy, 2017). *American Heart Association* pada tahun 2010 menyatakan 75% kematian akibat penyakit kardiovaskuler di Amerika Serikat terjadi karena aterosklerosis (Chen and Khismatullin, 2015). Angka kematian yang disebabkan oleh PJK mencapai 1,8 juta kasus pada Tahun 2020, yang artinya PJK menjadi penyakit yang mematikan di kawasan Asia salah satu negaranya adalah Indonesia (World Health Organization, 2017)

Salah satu penyebab aterosklerosis adalah oksidasi *low density lipoprotein* (LDL). Semakin tinggi konsentrasi LDL dalam darah semakin tinggi kemungkinan akan mengalami modifikasi, seperti LDL yang teroksidasi *oxidized low density lipoprotein* (ox-LDL) (Lien et al., 2021). Penatalaksanaan aterosklerosis saat ini sebagian besar terkonsentrasi pada usaha untuk menurunkan kadar lipid dalam plasma yang dikombinasikan dengan terapi antiinflamasi.

Andrographis paniculata atau sambiloto merupakan tanaman obat yang digunakan secara luas tidak saja di Indonesia, tetapi juga di Asia Tenggara, India dan Cina (Low et al., 2015). Beberapa aktivitas farmakologi andrografolid yang telah dilaporkan adalah antimikroba, antiprotozoa, antiinflamasi, antioksidan, imunostimulan, sitotoksik, antimalaria, antidiabetik dan kanker pada manusia (Dai et al., 2019; Pandey et al., 2019; Marangyana et al., 2022; Marangyana and Ugrasena, 2017; Ugrasena et al., 2022). Penelitian Low et al (2015) yang dilakukan secara *in vitro* menunjukkan bahwa andrografolid mempunyai efek antiinflamasi melalui penghambatan *Tumor Necrosis Factor*

Alpha (TNF- α). Al Batran et al (2014) berdasarkan penelitiannya bahwa andrografolid dapat menurunkan kadar IL-1 β , IL-6 dan *Creactive protein* (CRP) pada kelinci yang diinduksi aterosklerosis dengan menggunakan *Porphyomonas gingivalis*. Saat ini pengobatan aterosklerosis berfokus pada peran sitokin dan unit protein lainnya yang mempengaruhi keparahan inflamasi pada pembuluh darah. Studi menyebutkan bahwa faktor penting terjadinya aterosklerosis yang berhubungan hiperglikemia yaitu *advanced glycation end products* (AGE), stres oksidatif, dan aktivasi protein kinase C (PKC) (Yuan et al., 2019). Protein kinase C berperan dalam tahap inisiasi hingga perkembangan aterosklerosis. Salah satunya Protein Kinase C (PKC) β II yang mengatur sirkulasi kadar LDL hati, mengatur pembentukan sel busa, aktivasi sel endotel (EC) untuk mengekspresikan molekul adhesi, mengatur sekresi metaloproteinase matriks (MMP) di EC selama aterosklerosis (Lien et al., 2021).

Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid pada protein kinase C (PKC) β II sebagai anti aterosklerosis dengan metode analisis *in silico*. Aktivitas dan mekanisme anti-inflamasi perlu dilakukan pada ketiga senyawa tersebut yang berkontribusi dalam efek anti-inflamasi salah satunya dapat menghambat aktivitas protein target yaitu (PKC)- β II. Saat ini belum dilaporkan mekanisme penghambatan andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid pada protein kinase C (PKC) β II. Pengujian *in silico* dilakukan sebagai penelitian awal untuk mengetahui mekanisme molekuler andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid terhadap protein kinase C (PKC) β II.



Gambar 1. Struktur andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid yang dioptimalkan **(a)** andrografolid kalkulasi single point **(b)** andrografolid optimasi geometri **(c)** neoandrografolid kalkulasi single point **(d)** neoandrografolid optimasi geometri **(e)** deoxyandrografolid kalkulasi single point **(f)** deoxyandrografolid optimasi geometri.



Gambar 2. Protein Kinase C (PKC) β II **(a)** Chain A PKC β II tanpa native ligand **(b)** native ligand PDS

2. METODE PENELITIAN

Optimalisasi struktur andrografolid, deoxyandrografolid dan neoandrografolid

Struktur andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid diunduh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kemudian dioptimalkan menggunakan HyperChem 8. Optimasi dilakukan dengan menggunakan metode komputasi semi-empiris AM1 (Austin Model 1) dan perhitungan energy optimasi *single point* dan geometri.

Preparasi protein kinase C (PKC) β II

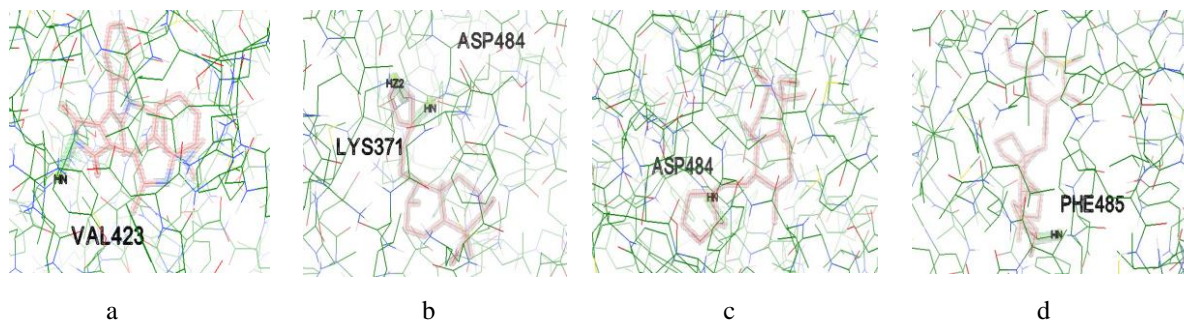
Protein kinase C (PKC) β II (PDB ID: 2i0e) diunduh dari <https://www.rcsb.org>. Protein PKC β II disiapkan dengan cara dipisahkan dari ligan PDS (3-[1-[3-(dimethylamino) propyl] - 2 - methylindol - 3 - yl] - 4 -(2 - methyl - 1 H - indol - 3 - yl)pyrrole-2,5-dione) menggunakan program Chimera 1.10.1.

Validasi *Molecular docking*

Validasi dilakukan dengan menggunakan aplikasi Autodock 4.2 dan Autogrid. Dilakukan dengan *redocking native ligand* PDS ke protein PKC β II yang telah dipreparasi. *Grid box* diatur dan disesuaikan dengan nilai $x = 40 \text{ \AA}$, $y = 40 \text{ \AA}$, $z = 40 \text{ \AA}$; *grid center* $x = 38,744 \text{ \AA}$, $y = 55,434 \text{ \AA}$, $z = 34,837 \text{ \AA}$. Validasi ditentukan dari nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Nilai RMSD $\leq 3.0 \text{ \AA}$ dianggap valid (Saputra et al., 2021).

Docking andrografolid, deoxyandrografolid dan neoandrografolid pada PKC β II

Struktur andrografolid, neoandrografolid dan deoxyandrografolid yang telah dioptimalkan kemudian dirapatkan ke protein target menggunakan Autodock 4.2 dengan ukuran *grid box* dan *grid center* yang sama sesuai hasil validasi. Hasil *docking* berupa energi ikatan dan ikatan yang terbentuk antara senyawa dan protein target.



Gambar 3. Visualisasi interaksi (a) Interaksi native ligand PDS dengan PKC β II (b) Interaksi andrografolid dengan PKC β II (c) Interaksi deoksiandrografolid dengan PKC β II (d) Interaksi neoandrografolid dengan PKC β II

Tabel 1. Hasil *docking native ligand* PDS dengan PKC β II

Protein	Ligan	Konformasi	RMSD (Å)	Energi Ikatan (kkal/mol)	Residu Asam Amino	Gugus dalam Ikatan Hidrogen
PKC β II	PDS	1	2,14	-9,59	VAL423	HN
		2	2,24	-9,09	VAL423	HN
		3	1,59	-9,73	VAL423	HN
		4	1,11	-9,76	VAL423	HN
		5	2,20	-9,44	VAL423	HN
		6	2,19	-9,30	VAL423	HN
		7	1,02	-9,48	VAL 423	HN
		8	2,26	-9,17	VAL423	HN
		9	1,35	-9,41	VAL423	HN
		10	1,99	-9,51	VAL423	HN

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Optimasi struktur andrografolid, deoksiandrografolid dan neoandrografolid

Optimalisasi andrografolid memberikan nilai energi *single point* sebesar -5651,94 kkal/mol dan optimasi geometri -5878,36 kkal/mol. Deoksiandrografolid memberikan energi *single point* sebesar -5601,90 kkal/mol dan energy optimasi geometri -5779,57 kkal/mol. Neoandrografolid dengan energi *single point* -7584,29 kkal/mol dan energi optimasi geometri sebesar -5878,36 kkal/mol (gambar 1).

3.2 Preparasi protein kinase C (PKC) β II

Protein kinase C (PKC) β II dibuat dengan memisahkan protein dari *native ligand*. PKC β II tanpa *native ligand* PDS dan *native ligand* PDS terpisah divisualisasikan pada Gambar 2.

3.3 Validasi *Molecular docking*

Validasi bertujuan untuk menentukan kesamaan konformasi antara *native ligand* dan protein dibandingkan dengan hasil percobaan. Hasil menunjukkan sepuluh konformasi *native*

ligand PDS ke sisi pengikatan PKC β II dengan nilai RMSD dan energi ikatan yang bervariasi. Konformasi yang dipilih adalah konformasi dengan nilai RMSD terendah dan memenuhi persyaratan validasi (RMSD \leq 3.0 Å) (Saputra et al., 2021). Penelitian ini menggunakan nilai RMSD 1,02 Å pada konformasi 7 (Tabel 1).

***Docking* andrografolid, deoxyandrografolid dan neoandrografolid pada PKC β II**

Andrografolid, deoxyandrografolid dan neoandrografolid yang telah dioptimalisasi di kaitkan ke sisi ikatan PKC β II menggunakan *grid box* saat validasi. Hasil *docking* menunjukkan sepuluh konformasi senyawa aktif dengan PKC β II. Konformasi dengan energi ikatan terendah menunjukkan konformasi yang paling stabil. Energi ikatan *native ligand*, andrografolid, deoksiandrografolid, neoandrografolid dengan PKC β II berturut-turut adalah -9,48 kkal/mol (Tabel 1), -8,84 kkal/mol (Tabel 2), -9,05 kkal/mol (Tabel 3) ,dan -9,53 kkal/mol (Tabel 4).

Tabel 2. Hasil *docking native ligand* andrografolid dengan PKC β II

Protein	Ligan	Konformasi	RMSD (Å)	Energi Ikatan (kkal/mol)	Residu Asam Amino	Gugus dalam Ikatan Hidrogen
PKC β II	Andrografolid	1	72,29	-8,84	LYS371 ASP484	HZ2 HN
		2	72,27	-8,83	LYS371 ASP484	HZ2 HN
		3	72,28	-8,82	LYS371 ASP484	HZ HN
		4	72,29	-8,80	LYS371 ASP484	HZ2 HN
		5	72,29	-8,83	LYS371 ASP484	HZ2 HN
		6	72,31	-8,81	LYS371 ASP484	HZ2 HN
		7	72,29	-8,83	LYS371 ASP484	HZ2 HN
		8	72,29	-8,81	LYS371 ASPA	HZ2 HN
		9	72,28	-8,81	LYS371 ASPA	HZ2 HN
		10	72,29	-8,83	LYS371 ASP484	HZ2 HN

Tabel 3. Hasil *docking native ligand* deoksiandrografolid dengan PKC β II

Protein	Ligan	Konformasi	RMSD (Å)	Energi Ikatan (kkal/mol)	Residu Asam Amino	Gugus dalam Ikatan Hidrogen
PKC β II	deoksiandrografolid	1	71,48	-9,05	ASP484	HN
		2	71,49	-9,04	ASP484	HN
		3	71,48	-9,04	ASP484	HN
		4	71,47	-9,04	ASP484	HN
		5	71,47	-9,03	ASP84	HN
		6	71,47	-9,04	ASP484	HN
		7	71,50	-9,04	ASP484	HN
		8	71,49	-9,04	ASP484	HN
		9	71,51	-9,04	ASP484	HN
		10	71,49	-9,04	ASP484	HN

Tabel 4. Hasil *docking native ligand* neoandrografolid dengan PKC β II

Protein	Ligan	Konformasi	RMSD (Å)	Energi Ikatan (kkal/mol)	Residu Asam Amino	Gugus dalam Ikatan Hidrogen
PKC β II	neoandrografolid	1	71,62	-9,13	ASP484	HN
		2	71,79	-8,75	UNL1	O
		3	71,88	-9,35	PHE485	HN
		4	71,83	-8,75	UNL1	O
		5	73,83	-9,09	ASP484	HN
		6	71,82	-8,71	UNL1	O
		7	71,89	-9,45	LYS371	HZ2
		8	71,87	-9,51	LYS371	HZ2
		9	72,89	-9,53	LYS371	HZ2

3.2 Pembahasan

Pada proses optimasi senyawa uji dilakukan perhitungan awal dengan kalkulasi single point untuk menentukan energi total molekul dari struktur tanpa suatu proses optimasi struktur senyawa uji. Optimasi geometri adalah suatu proses untuk meminimalisasi energi sehingga diperoleh struktur senyawa uji yang paling stabil, ditandai dengan penurunan energi total dari struktur senyawa uji (Reddy et al., 2020). Senyawa uji andrografolid, deoxyandrografolid dan neoandrografolid berpotensi sebagai agen antiaterosklerosis yang dikembangkan dengan metode *in silico*. Energi ikatan andrografolid, deoksiandrografolid, neoandrografolid dengan PKC β II berturut-turut adalah -8,84 kkal/mol, -9,05 kkal/mol, dan -9,53 kkal/mol, sedangkan *native ligand* PDS adalah -9,48 kkal/mol.

Berdasarkan besaran energi ikatan, senyawa neoandrografolid stabil dan afinitas lebih tinggi pada PKC β II dibandingkan dengan *native ligand* PDS. Andrografolid dan deoksiandrografolid keduanya memiliki potensi yang sama untuk berikatan dengan PKC β II sebagai antiaterosklerosis. Penelitian Warditiani et al (2020) menyebutkan bahwa AND berinteraksi dengan baik pada Protein NF-kB, ICAM-1, VCAM-1, TNF α , IFN- γ dan Cyt MAP kinase P32 bertanggung jawab untuk efek antiaterosklerotik dengan metode *in silico*.

Burgos et al (2021) menyebutkan bahwa andrographolide mengganggu efek phorbol myristate acetate (PMA) activator langsung protein kinase C (PKC) dan menunjukkan bahwa terjadi penghambatan produksi ROS melalui modulasi jalur yang bergantung pada PKC.

Cahyawati (2021) menyebutkan bahwa andrografolid, deoxyandrografolid dan neoandrografolid memiliki potensi efek vasorelaksan dengan mempengaruhi sel otot polos pembuluh darah, menghambat aktivasi ERK1/2, p38MAPK, dan NF-KB yang diinduksi oleh ox-LDL. Penghambatan pada jalur ini kemungkinan menjadi salah satu penyebab terhambatnya pembentukan plak aterosklerosis pada pembuluh darah. Hasil energi ikatan antara ketiga senyawa uji menunjukkan neoandrografolid membentuk ikatan lebih stabil dibandingkan andrografolid dan deoksiandrografolid. Neoandrografolid juga menghambat produksi NO dan TNF- α pada Makrofag yang diinduksi LPS, berkontribusi pada aktivitas anti aterosklerosis dan anti-inflamasi (Bhat and Murthy, 2021; Cahyawati, 2021; Liu et al., 2007).

Energi ikatan antara tiga senyawa uji dengan satu protein target semuanya bernilai negatif sehingga senyawa uji andrografolid, neoandrografolid dan deoksiandrografolid mampu berikatan dengan protein target PKC- β II dengan ikatan yang stabil. Ikatan hidrogen merupakan ikatan dipol-dipol yang terbentuk berdasarkan suatu proton dari gugus X-H (X merupakan suatu atom elektronegatif) dengan atom elektronegatif lain (Y) yang mempunyai pasangan elektron bebas. Ikatan hidrogen dalam suatu molekul yang terbentuk signifikan jika X dan Y atom hidrogen (H) dengan atom nitrogen (N), oksigen (O), dan fluor (F). Ikatan hidrogen memiliki nilai $\Delta G = -1$ sampai -7 kkal/mol (Rollando, 2017). Kemampuan senyawa uji dalam menempati *binding site* protein target menunjukkan ketiga senyawa ini memiliki potensi dalam menginhibisi protein

target *PKC-βII*. Energi ikatan dari ketiga senyawa uji dengan protein target bernilai lebih rendah (negatif) dibandingkan dengan *native ligand* nya sehingga afinitasnya sebagai inhibitor dari protein target *PKC-βII* lebih kuat dan lebih stabil (Abuzaid et al., 2020; Bhat and Murthy, 2021; Diyah et al., 2013).

4. KESIMPULAN

Senyawa uji andrografolid, deoksiandrografolid, neoandrografolid dan memiliki afinitas terhadap protein kinase C (PKC)-βII berdasarkan energi ikatan yang terbentuk berdasarkan metode *in silico*. Andrografolid, neoandrografolid, dan deoksiandrografolid berpotensi dalam menghambat pembentukan *PKC-βII* dan memiliki aktivitas sebagai anti arterosklerosis secara *in silico*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Abuzaid, H., Amin, E., Moawad, A., Usama Ramadan, Abdelmohsen, Hetta, M., Mohammed1, R., 2020. *Pharmacognosy Res.* 10, 24–30.
- Al Batran, R., Al-Bayaty, F., Jamil Al-Obaidi, M.M., Hussain, S.F., Mulok, T.Z., 2014. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Bhat, M.A., Murthy, H.N., 2021. *Pharmacogn. J.* 13, 669–674.
- Burgos, R.A., Alarcón, P., Quiroga, J., Manosalva, C., Hancke, J., 2021. *Molecules* 26, 1–18.
- Cahyawati, P.N., 2021. *WICAKSANA J. Lingkungan dan Pembang.* 5, 19–24.
- Chen, C., Khismatullin, D.B., 2015. *PLoS One* 10, 1–20.
- Dai, Y., Chen, S.R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Yitao, Wang, Ying, 2019. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, S17–S29.
- Diyah, N.W., Siswandono, Hardjono, S., Purwanto, B.T., 2013. *Berk. Ilm. Kim. Farm.* 2, 1–8.
- Hamidy, M.Y., 2017. *JIK* 11, 59–64.
- Lien, C.F., Chen, S.J., Tsai, M.C., Lin, C.S., 2021. *Front. Pharmacol.* 12, 1–12.
- Liu, J., Wang, Z.T., Ji, L.L., 2007. *Am. J. Chin. Med.* 35, 317–328.
- Low, M., Khoo, C.S., Münch, G., Govindaraghavan, S., Sucher, N.J., 2015. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 1–9.
- Marangyana, I.G.B.I., Ugrasena, P.Y., 2017. *Acta Holist. Pharm.* 2, 21–27.
- Marangyana, I.G.B.I., Ugrasena, P.Y., Monika, N.L.G.M., 2022. *J. Mandala Pharmacon Indones.* 8, 67–80.
- Maulida, M., Mayasari, D., Rahmayani, F., 2018. *Majority* 7, 214–218.
- Mishra, S.K., Tripathi, S., Shukla, A., Oh, S.H., Kim, H.M., 2016. *Front. Biosci.* 7, 292–304.
- Pandey, A., Gulati, S., Gupta, A., Tripathi, Y., 2019. *Pharma Innov. J.* 8, 140–144.
- Reddy, P.K., Srinivas, S., Rao, B.R., 2020. *World J. Pharm. Res.* 9, 1231–1238.
- Saputra, M.A.W., Mahaswari, A.A.I.R., Anggreni, N.K.S., Putri, W.N.E., Laksmani, N.P.L., 2021. *Pharm. Reports* 1, 16.
- Ugrasena, P.Y., Puspitasari, D.R.A., Rupyantini, D.A., 2022. *J. Pharmactive* 1, 1–6.
- Warditiani, N.K., Sari, P.M.N.A., Ramona, Y., Wirasuta, M.A.G., 2020. *Syst. Rev. Pharm.* 11, 201–206.
- World Health Organization (WHO), 2017. *Cardiovascular diseases (CVDs)*.
- Yuan, T., Yang, T., Chen, H., Fu, D., Hu, Y., Wang, J., Yuan, Q., Yu, H., Xu, W., Xie, X., 2019. *Redox Biol.* 20, 247–260.