

DOCKING MOLEKULAR POTENSI ANTI DIABETES MELITUS TIPE 2 TURUNAN ZERUMBON SEBAGAI INHIBITOR ALDOSA REDUKTASE DENGAN AUTODOCK-VINA

Karisma Enggar Saputri, Nurul Fakhmi, Erwinda Kusumaningtyas, Dedy Priyatama, Broto Santoso*

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

*Alamat Korespondensi: Broto.Santoso@ums.ac.id

Abstrak: Obat anti-diabetes yang telah dipasarkan seperti Epalrestat, Ponalrestat, Pioglitazone dan Sitagliptin serta turunan zerumbon pada penelitian sebelumnya memiliki aktivitas anti diabetes, perlu diketahui bagaimana mekanisme interaksinya terhadap protein target aldosa reduktase (2HV5). Protein target aldosa reduktase dipreparasi menggunakan UCSF Chimera. Penelitian ini telah dilakukan dengan menggunakan ligan uji termasuk empat senyawa tersebut, yaitu ligan dataset (50 senyawa) dan decoys dari dude.docking.org, dan 25 senyawa turunan zerumbon. Semua ligan dilakukan docking molekular menggunakan Program PyRx dengan program Vina dan AutoDock (Lamarckian Genetic Algorithm (LGA), Genetic Algorithm (GA) dan Monte Carlo Simulated Annealing (SA)). Hasil yang diperoleh berupa nilai binding affinity (kkal/mol) ligan terhadap protein. Program PyMOL dan PLIP (Protein Ligand Interaction Profiler) digunakan untuk memvisualisasikan konformasi 3D molekul dan interaksi ligan-protein. Perangkat keras yang digunakan komputer personal dengan spesifikasi prosesor Intel® Atom™ CPUN2600 @ 1,60 GHz, RAM 2GB, Windows 7. Hasil docking didapatkan bahwa ZER (SA, -6,99 kkal/mol), ZER08 (vina, -10,9 kkal/mol) dan ZER11 (LGA, -11,26 kkal/mol dan GA, -11,17 kkal/mol) mempunyai nilai binding affinity lebih baik dibandingkan dengan keempat senyawa obat tetapi, nilai ini tidak lebih baik dibandingkan dengan ligan natif, dataset dan decoys. Hasil interaksi ligan-protein yang terjadi melibatkan residu PHE-122 dan VAL-47, dan hal ini ditemukan sama untuk ketiga senyawa turunan zerumbon tersebut dengan ligan natif. Ketiga turunan zerumbon ini dapat dilanjutkan uji aktivitas in vitro di laboratorium.

Kata kunci: Anti diabetes, zerumbon, docking Molekular, PyRx, PyMOL

Abstract: Several of anti-diabetic medicines that had been marketed as Epalrestat, Ponalrestat, Pioglitazone, Sitagliptin and zerumbone derivatives that in previous research showed antidiabetic activity, needed to know how their virtual of chemical interaction against the target protein Aldose reductase (2HV5). Aldose reductase as target protein was prepared using UCSF Chimera. This research has been carried out by using test ligands including four of the compounds and also a ligand dataset (50 compounds), decoys compounds collected from dude.docking.org and 25 derivatives of zerumbone. Molecular docking of all ligands were finished using program PyRx-Vina and AutoDock (LGA, GA and SA) and the results were presented as binding affinity values (kcal/mol) of ligand against protein. Program PyMOL and PLIP were used to visualize the 3D molecular of docked conformation and ligand-protein interactions. This research used personal computer with specifications: Intel® Atom™ processor CPUN2600 @ 1.60 GHz, 2GB RAM and Windows 7. The results showed that ZER (SA, -6.99 kcal/mol), ZER8 (vina, - 10.9 kcal/mol) and ZER11 (LGA, -11.26 kcal/mol and GA, -11.17 kcal/mol) had a better value of binding affinity than the fourth branded compounds. However, these value were lower than the native ligand, datasets and decoys. The involved residue of PHE-122 and VAL-47 in ligand-protein interaction had been found. The same happened for the best of derivative zerumbone and native ligands. These result supported that zerumbone derivatives should be continued to the in vitro assay in the laboratory.

Keywords: Antidiabetic, zerumbon, molecular docking, PyRx, PyMOL

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus Tipe-2 adalah suatu penyakit gangguan metabolik yang di tandai dengan kenaikan gula darah akibat penurunan sekresi insulin oleh sel beta pankreas dan atau gangguan pada fungsi insulin (resistensi insulin). Hasil penelitian Kesehatan Dasar tahun 2008 menunjukkan angka kejadian penyakit Diabetes Melitus di Indonesia mencapai 57%, sedangkan kejadian di dunia, penyakit diabetes melitus tipe 2 adalah 95%. Faktor resiko dari Diabetes melitus tipe 2 yaitu usia, jenis kelamin, obesitas, hipertensi, genetik, makanan, merokok,

alkohol, kurang aktivitas, dan lain sebagainya (Fatimah, 2015). Untuk pengobatan diabetes melitus tipe 2 dapat digunakan obat-obat yang mampu mempengaruhi protein aldosa reduktase. Struktur kristal protein dengan kode PDB 2HV5 merupakan suatu aldosa reduktase. Enzim aldosa reduktase adalah enzim yang terdapat di beberapa bagian tubuh dan berfungsi dalam metabolisme glukosa jalur poliol yang bertanggung jawab dalam pembentukan fruktosa dan glukosa. Peningkatan aktivitas aldosa reduktease dapat memicu peningkatan konsentrasi

gula darah pada pasien diabetes sehingga insulin menjadi tidak sensitif (Trueblood & Ramsay, 1998).

Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa aldosa reduktase (AR) tidak hanya terikat dengan zopolrestat tetapi terdapat 4 molekul inhibitor yang terikat dengan protein. Hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut dapat berikatan dengan obat antidiabetes dan membentuk konformasi struktur yang dapat menghambat AR (Steuber *et al.*, 2006).

Protein AR dapat berikatan dengan obat diabetes (tolrestat) menyebabkan terjadinya peristiwa glukosa pada sel diubah menjadi sorbitol fruktosa. Enzim ini mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol dengan jalur reduksi gugus aldehid glukosa. Dalam keadaan normal sorbitol dalam sel rendah tetap pada keadaan hiperglikemia kadar sorbitol dalam sel tinggi dan akan diubah menjadi fruktosa oleh enzim sorbitol dehidrogenase.

Zerumbon merupakan senyawa isolat utama yang terdapat dalam rimpang keluarga tanaman Zingiber dan diketahui memiliki aktivitas anti diabetes baik dalam bentuk ekstraknya atau secara kajian virtual (Sakika *et al.*, 2014; Santoso *et al.*, 2014)

Docking molekular merupakan komputasi untuk memprediksi suatu hubungan apakah senyawa tersebut mempunyai aktifitas sebelum diujikan. Percobaan dengan docking molekular ini untuk melihat obat diabetes millitus yang beredar mempunyai aktifitas dalam menghambat enzim aldosa reduktase. Molecular docking dapat dilakukan dengan banyak software yang berbayar maupun yang gratis. Penelitian ini menggunakan software PyRx untuk docking dan menggunakan program Vina dan Autodock (LGA, GA dan SA).

Program PyRx-Vina dipilih karena tidak berbayar (gratis), mudah dioperasikan, akurat, memiliki tingkat error yang rendah dan hasilnya dapat dipercaya (Trott & Olson, 2010). Metode Vina sendiri merupakan salah satu metode yang terdapat di program PyRx. Jika dibandingkan dengan program gratis lainnya, Vina memiliki keunggulan dalam melakukan docking yang cepat dan akurat. Proses docking dibutuhkan adanya senyawa pembanding, senyawa decoys dan senyawa aktif yang telah dipasarkan.

Senyawa aktif pembanding membandingkan senyawa obat yang kita coba bandingkan apakah senyawa tersebut mempunyai aktivitas atau tidak. Senyawa decoys merupakan senyawa yang di alam yang tidak mempunyai aktivitas biologik. Dengan adanya senyawa pembanding-pembanding kita dapat melihat senyawa obat yang kita ujikan apakah benar benar mempunyai aktivitas sebagai antidiabetes.

Percobaan ini bertujuan untuk membandingkan senyawa obat di pasaran dengan senyawa yang di alam yang mempunyai aktivitas sebagai anti diabetes dan untuk mengetahui perbandingan interaksi ligan-protein antara obat anti diabetes yang di pasaran

mempunyai aktivitas sebagai antidiabetes dengan turunan zerumbon dan senyawa pembanding lainnya.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Perangkat keras yang digunakan yaitu notebook dengan spesifikasi prosesor Intel(R) Atom(TM) CPUN2600 @ 1,60 GHz, RAM 2GB, Windows 7 32-bit sebagai sistem operasi. Perangkat lunak yang digunakan adalah PyRx (Vina dan AutoDock), MarvinBean Suite, PyMOL, PLIP dan Chimera.

Subjek Penelitian

Protein target yang digunakan aldosa reductase pada manusia. Kristal protein ini dapat diunduh dari www.pdb.org dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 2HV5: Human Aldose Reductase complexed with inhibitor zopolrestat after three days soaking yang terdapat pada organisme homo sapiens dengan X-Ray diffraction yang berada pada resolusi pengukuran adalah 1,59Å.

Ligan natif yang digunakan adalah zopolrestat dari protein 2HV5, senyawa antidiabetes: epalrestat, pioglitazone, ponalrestat, dan sitagliptin yang telah dipersiapkan dan dilakukan preparasi, senyawa novel turunan zerumbon, dataset dan decoys yang diperoleh dari database dude.docking.org.

Prosedur Penelitian

Preparasi Protein dan Ligan

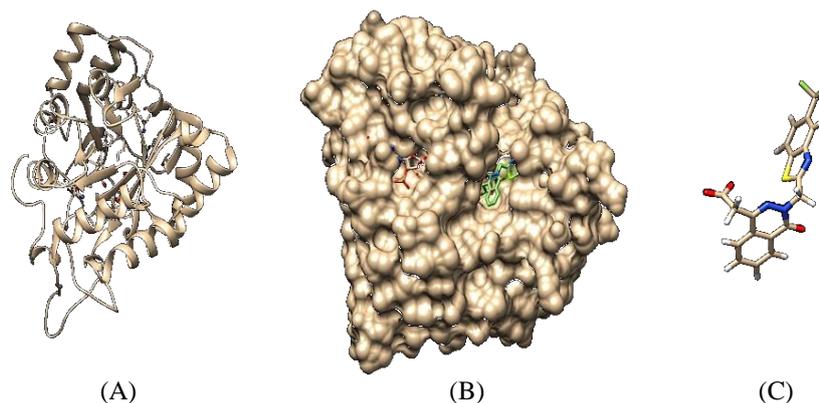
Perangkat lunak Chimera digunakan untuk memisahkan ligan natif dari protein sehingga memperoleh berkas ligan natif, protein tanpa ligan dengan mengabaikan keberadaan air dalam ekstensi pdb. Ligan senyawa antidiabetes dihasilkan dengan memanfaatkan MarvinBean Suite sehingga diperoleh struktur kimia 3D masing-masing senyawa. Protein dan ligan dipersiapkan untuk menjadi berkas siap pakai dengan menggunakan fasilitas konversi AutoDock dan openbabel di dalam PyRx.

Validasi Metode Docking

Docking terhadap ligan natif dilakukan untuk mencari konformasi 3D ligan natif terhadap reseptor dengan memperhatikan koordinat pusat masa struktur dan besaran gridbox dari binding site pocket dalam satuan angstrom (Vina) atau number of points (AutoDock). Konformasi hasil docking yang diperoleh disejajarkan dengan konformasi ligan natif hasil pengukuran kristalografi yang dinyatakan dalam nilai root mean square deviation (RMSD). Hasil penelitian sebelumnya, nilai RMSD untuk kesejajaran konformasi struktur yang masih dapat diterima adalah kurang dari 5, semakin mendekati nilai 0 maka nilai kesejajaran semakin baik .

Docking Molekular dan Analisis Data

Docking ligan uji dilakukan untuk menghasilkan nilai binding energi dalam satuan kkal/mol. Nilai binding energy yang digunakan adalah yang memperoleh nilai semakin minus,



Gambar 1. Hasil preparasi protein 2HV5. Tampilan 3D bentuk ribbon (A) dan molecular surface (B) dari protein, ligan natif (C) yang telah dipisahkan.

nilai minus 12 maka kekuatan ikatan dapat dipastikan terjadi. Masing masing data yang diujikan diambil 2 data terbaik.

Data ligan uji yang sudah dikumpulkan dibandingkan dengan ligan natif. Data interaksi ligan protein ditampilkan dengan menggunakan PyMOL dan PLIP untuk melihat residu yang terlibat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Makromolekul protein target, aldosa reduktase, memiliki satu rantai protein yaitu rantai A. Ligan dan protein berhasil dipreparasi dan didapatkan protein tanpa ligan dan ligan (natif). Protein-ligan dilakukan preparasi dengan menggunakan program UCSF Chimera untuk mendapatkan keutuhan geometri molekul 3D protein target dari rantai samping yang tidak lengkap. Dunbrack rotamer library digunakan dalam proses ini (Santoso, 2011; Dunbrack, 2002). Chimera digunakan untuk mengadopsi langkah preparasi protein melalui perintah Dock Prep untuk program docking Dock6.

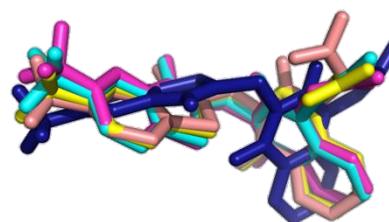
Kelebihan ini yang berhasil digunakan untuk melakukan docking molekular dengan program PyRx sebelumnya (Luthfiyah & Santoso, 2014) seperti Gambar 1. Validasi ligan asli dari protein target dilakukan setiap algoritma docking.

Validasi tersebut dilakukan untuk mengetahui kemiripan konformasi antara ligan natif kristalografi dengan ligan natif hasil optimasi docking (Luthfiyah & Santoso, 2014). Proses docking perlu menentukan koordinat pusat tempat interaksi ligan dan protein, biasanya adalah pusat massa dari ligan natif, yaitu X=16,645, Y=-6,714, dan Z=14,124.

Tabel 1. Besaran dimensi gridbox docking molekular (*=points) yang digunakan dalam penelitian

Algoritma	X	Y	Z
Vina (Å)	50	50	50
AD-LGA*	25	32	40
AD-GA*	25	32	40
AD-SA*	50	50	50

Radius 3D dari grid box yang digunakan terdapat pada Tabel 1. Nilai ini diperoleh dari hasil optimasi. Perbedaan nilai dikarenakan adanya satuan jarak yang tidak sama, Å untuk vina sedangkan lainnya, points. Untuk SA digunakan nilai maksimal dalam PyRx karena tidak diperoleh nilai optimalnya. Kedekatan konformasi 3D ligan natif dinyatakan dengan nilai RMSD. Hasil penelitian ini (Gambar 2) diperoleh data bahwa semua ligan natif hasil docking untuk semua algoritma memiliki konformasi yang mirip dengan ligan natif hasil pengukuran dengan kristalografi dikarenakan nilai RMSD masih di bawah 5. Sistem docking untuk pusat massa dan besaran volume gridbox sudah cocok, valid dan dapat digunakan untuk ligan lainnya, seperti ligan uji (senyawa novel) atau senyawa obat. Pengujian sistem docking diperlukan sebagai cara mendekati prediksi hasil dan kemiripan interaksi ligan-protein dengan natif.

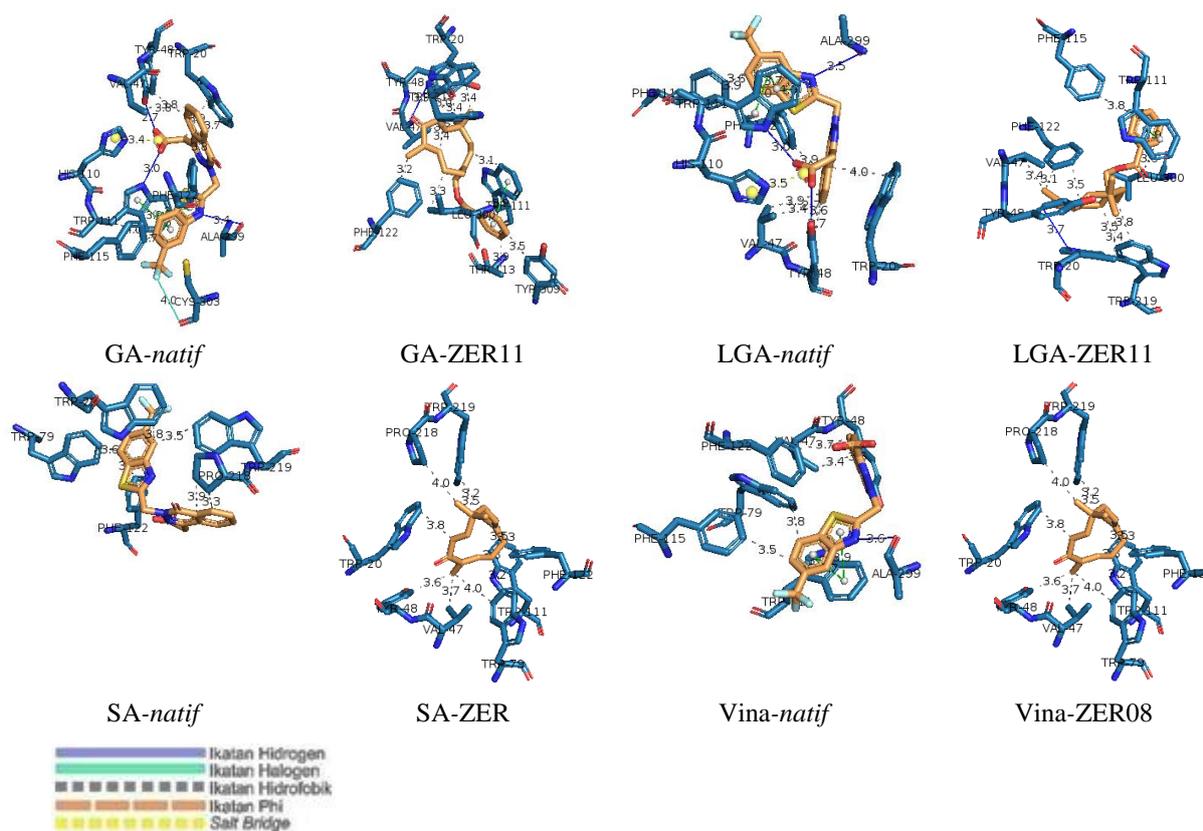


Gambar 2. Konformasi 3D hasil docking dibandingkan dengan natif (kuning) dinyatakan dalam RMSD, 0,490 (LGA, merah muda), 0,181 (GA, coklat), 2,256 (SA, biru) dan 0,546 (Vina, merah muda)

Berdasarkan hasil docking antara ligan dengan reseptor yang diperoleh dari konformasi ligan dengan energi terkecil. Binding affinity merupakan ukuran kemampuan obat untuk berikatan dengan reseptor. Semakin kecil nilai binding affinity maka, afinitas antara reseptor dengan ligan semakin tinggi begitu

Tabel 2. Nilai energi binding affinity dari ligan natif dan senyawa obat yang diuji

Algoritma	Binding Affinity (kcal/mol)							
	Natif	Ponalrestat	Pioglitazone	Epalrestat	Sitagliptin	Best-dataset	Best -novel	Best-decoys
Vina	-11,60	-10,30	-9,30	-9,70	-10,50	-12,70	-10,90	-10,40
LGA	-11,61	-9,52	-8,51	-9,18	-7,93	-12,38	-11,26	-9,79
GA	-11,51	-9,82	-8,15	-8,96	-7,68	-11,70	-11,17	-9,75
SA	-3,38	-3,63	-3,85	-3,67	-2,43	-7,25	-6,99	-6,73



Gambar 3. Visualisasi interaksi ligan dengan residu reseptor yang terdapat pada permukaan binding site pocket menggunakan PLIP untuk ligan natif dan senyawa turunan zerumbon sebagai ligan novel.

pula sebaliknya jika semakin besar nilai binding affinity maka afinitas antara reseptor semakin rendah. Hasil data seperti yang diperlihatkan pada Tabel 2 menunjukkan nilai energi dari natif ligan dan senyawa obat yang diuji dengan menggunakan algoritma Vina, AutoDock (AD) GA (Genetic Algorithm), AD-LGA (Lamarckian GA), dan AD-SA (Simulated Annealing). Senyawa uji yang akan dibandingkan dengan ligan natif yaitu ponalrestat, pioglitazone, epalrestat, dan sitagliptin. Hasil pada Tabel 2, nilai binding affinity keempat senyawa uji tidak ada yang melebihi nilainya dibandingkan dengan ligan natif. Hal ini menunjukkan bahwa afinitas ikatan antara reseptor aldosa reduktase

dengan ligan semakin rendah dan diprediksi hasil uji berikutnya tidak lebih baik untuk protein target ini.

Best dataset (Tabel 2) mempunyai nilai ligan binding affinity lebih baik dibanding natif pada metode Vina, AD-GA dan AD-LGA. Berbeda halnya dengan nilai binding affinity untuk ZER (SA, -6.99 kcal/mol), ZER8 (Vina, -10.9 kcal/mol), ZER11 (LGA, -11.26 kcal/mol dan GA, -11.17 kcal/mol) memiliki nilai ikatan energi yang lebih baik dibanding dengan keempat senyawa yang ada di pasaran. Namun, nilai tersebut tidak lebih baik dibandingkan ligan natif.

Hasil visualisasi interaksi ligan dengan menggunakan PLIP ligan uji mampu membentuk ikatan hidrofobik yang dibentuk oleh residu yang

mirip dengan beberapa senyawa uji (ponalrestat, pioglitazon, epalrestat, dan sitagliptin) diantaranya ligan-protein TYR-48, PHE-122, VAL-47, TRP-20, TRP-111, dan LEU-300. Interaksi ligan protein PHE-122, VAL-47, dan TRP-111 ditemukan sama untuk ketiga senyawa turunan zerumbon tersebut dengan ligan natif. Hasil visualisasi PLIP juga menunjukkan jumlah asam amino yang sama pada ligan uji yaitu ZER (SA, 100%), ZER8 (vina, 60%), ZER11 (LGA, 100% dan GA, 83%). Hal tersebut menunjukkan jumlah kesamaan asam amino mampu diikat oleh ligan uji dan best novel dengan ligan asli. Ketiga turunan zerumbon ini dapat dilanjutkan uji aktivitas in vitro di laboratorium.

KESIMPULAN

Berdasarkan molekular docking, ketiga turunan zerumbon mempunyai nilai binding affinity lebih baik dibanding dengan keempat senyawa yang diuji. Hal ini menunjukkan bahwa keempat senyawa yang diuji kurang poten untuk menghambat aldosa reduktase. Ketiga turunan zerumbon dapat dilanjutkan uji aktivitas secara in vitro di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Dunbrack, R.L. Jr. (2002). Rotamer libraries in the 21st century, *Current Opinion in Structural Biology*, 12(4): 431-440.
- Fatimah, R.N. (2015). Diabetes Mellitus Tipe 2, *Majority*, 4(5): 93-101.
- Luthfiyah Y. & Santoso B. (2014). Pemodelan Tiga Dimensi (3D) Ikatan Hasil Docking Molekular Turunan Diketopiperazin (DKP) Dengan Bcl-2 Pada Sel MCF-7. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin 16.5.16, 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- Sakika, K.A., Hanwar, D., Suhendi, A., Kusumowati, I.T.D., & Santoso, B. (2014). Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Rimpang Lempuyang Emprit (*Zingiber amaricans* Bl) pada Tikus Putih yang Diinduksi Aloksan. Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terbaru Pemanfaatan Herbal sebagai Agen Preventif pada Terapi Kanker, Universitas Wahid Hasyim, Semarang, September 2014, 5-9
- Santoso, B. (2011). Docking Analog Kurkumin Turunan Piperazindion dengan Tubulin (1TUB) Rantai β Menggunakan Vina dan AutoDock. *Pharmacon*, 12(1): 14-18.
- Santoso, B., Hanwar, D., Suhendi, S., Kusumowati, I.T.D. & Melannisa, R. (2014). Docking Molekular Terbalik dari Senyawa Zerumbon. Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami [SPBOA] XVI & Muktamar XII PERHIPBA 2014 (ISBN: 978-602-225-861-2)
- Steuber, H., Zentgraf, M., Gerlach, C., Sotriffer, C.A., Heine, A. & Klebe, G. (2006). Expect the Unexpected or Caveat for Drug Designers: Multiple Structure Determinations Usin Aldose Reductase Crystals Treated under Varying Soaking and Co-crystallisation Conditions, *Journal of Molecular Biology*, 363(1): 174-187.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- Trott, O. & Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31: 455-461.
- Trueblood, N. & Ramasamy, R. (1998). Aldose Reductase Inhibition Improves Altered Glucose Metabolism of Isolated Diabetic Rat Hearts, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 275(1): H75-H83.