

IDENTIFIKASI AGEN ANTIDIABETES MELALUI JALUR PENGHAMBATAN ALDOSE REDUCTASE MENGGUNAKAN PyRx DENGAN EMPAT ALGORITMA MOLECULAR DOCKING

Agus Salim Maulana¹⁾, Kiki Wulansari²⁾, Devy Anwar Zhelsiana³⁾, Wiwin Sri Sulasmi⁴⁾ dan Broto Santoso⁵⁾

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

¹email: maulanasalimagus@gmail.com

²email: wulansari.kikii@gmail.com

³email: devyanwarz@gmail.com

⁴email: wiwinss10@gmail.com

⁵email: Broto.Santoso@ums.ac.id

Abstract

Aldosereductaseisaldo-ketoreductaseenzymethatconvertglucoseto sorbitol andfructosebypolyolpathway. Accumulationof sorbitol andoxidativestressduetochanges in theratioof NADPH/NADP⁺and NADH/NAD⁺causesomecomplicationofsecondary diabetes. Development ofaldosereductase inhibitor byalgorithmoleculardockingcouldbeexpectedtogivesomecompoundsthatpreventcomplicationof secondary diabetes. The methodwasdonebyusingcomputer Acer Aspire 4736 withprocessor Intel Core 2 Duo. The internal RAM ofthecomputeris 1GB and Windows 7 32bit as itsoperatingsystem. The compoundsthatweused in thismethod were theactivecompoundandthedecoysligands as comparisonfrom dude.docking.org, the 53N as thenativeligan. Fidarestat, Alrestatin, Tolrestat, and Inhibitor IDD384 isused as thebranded-drugcompound. The dockingresultshowedinterestingoutcomewhichwasseveralzerumbonderivatesshowedtheirbinding affinitybetterthanthenativeliganandtheotheractivecompounds. The futureresearchshouldusehardwarewithhigherspecificationtopreventerror.

Keywords: Human aldosereductase, antidiabetic, PyRx, AutoDock-Vina, 4YU1, 53N

1. PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan suatu penyakit metabolik kompleks yang ditandai dengan terjadinya peningkatan kadar glukosa dalam darah (Antony dan Vijayan, 2015). International Diabetes Federation (IDF) memperkirakan di Asia Tenggara pada tahun 2015 menunjukkan bahwa 8,5% (6,8-10,8%) dari populasi orang dewasa memiliki diabetes. Hal ini setara dengan 78,3% (62,9-100,4%) juta orang di Asia Tenggara hidup dengan diabetes (IDF, 2014). Aldosa reductase (ALR2) adalah salah satu enzim dari famili aldo-ketoreduktase. Enzim ini merupakan enzim pertama pada jalur poliol dan mengubah glukosa menjadi sorbitol dengan adanya NADPH sebagai kofaktor. Enzim aldosa reductase dihambat aksinya oleh *Aldose Reductase Inhibitor* (ARI)

(Alexiou *et al.*, 2009). Aldosa reductase memiliki peran fisiologis dengan cara melakukan metabolisme produk lemak peroksida yang berperan menimbulkan inflamasi. Signal inflamasi diinduksi oleh sitokin, faktor pertumbuhan, endotoksin, glukosa dalam jumlah tinggi, alergen dan reaksi autoimun (Stefek *et al.*, 2015).

Moleculardocking adalah metode dalam merancang obat dengan menggunakan fungsi skoring untuk memprediksi ikatan ligan-reseptor secara 3 dimensi. Salah satu contoh keberhasilan dari *moleculardocking* yaitu molekul RGD pentapeptide siklik pada integrin $\alpha V\beta 3$ (Grosdidier Zoete and Michielin, 2007). *Moleculardocking* secara luas telah digunakan dalam merancang obat modern. Metode *moleculardocking* dapat mengeksplorasi konformasi ligan yang

diadopsi dalam tempat ikatan dari target molekuler. Pendekatan ini juga memperkirakan energi bebas ikatan ligan-reseptor dengan mengevaluasi fenomena yang terlibat dalam proses pengenalan intermolekuler (Ferreira *et al.*, 2015).

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengidentifikasi agen anti-diabetes melalui jalur penghambatan Human Aldose Reductase (HAR) menggunakan berbagai algoritme *moleculardocking* yakni SA (*Simulated Annealing*), GA (*Genetic Algorithm*), LGA (*Lamarckian Genetic Algorithm*) dan AutoDock Vina). Manfaat dari percobaan ini adalah mendapatkan senyawa agen antidiabetik dengan mekanisme penghambatan HAR sehingga diharapkan akan membantu dalam pengobatan diabetes.

2. KAJIAN LITERATUR DAN PENGEMBANGAN HIPOTESIS

Aldose Reductase (AR) merupakan enzim yang berperan dalam proses metabolisme dan signaling seluler karena kemampuannya dalam mengurangi berbagai aldehida, mulai dari membran fosfolipid sampai glukosa. Enzim ini bekerja dengan mereduksi glukosa menjadi sorbitol yang merupakan langkah awal pada jalur poliol untuk mengkonversi glukosa menjadi fruktosa melalui sorbitol dehidrogenase (SDH). Dalam jalur ini, baik NADPH maupun NAD⁺ digunakan sebagai kofaktor enzim AR dan SDH. Apabila AR mengkatalisasi reduksi glukosa, dapat menyebabkan pembengkakan osmotik yang mengakibatkan ketidakseimbangan ionik dan ketidaklarutan protein yang mengindikasikan kataraktogenesis. Komplikasi yang lain yaitu retinopati, nefropati, dan neuropati. Penghambatan enzim tersebut dapat diharapkan mencegah perkembangan komplikasi diabetes pada hewan uji (Ramana and Satish, 2010).

Docking molekuler adalah sebuah studi yang aman dan mudah dalam melakukan investigasi, interpretasi, menjelaskan, dan mengidentifikasi sifat molekuler senyawa dalam bentuk struktur 3D, dengan memprediksi struktur dari kompleks intermolekuler yang terbentuk antara 2 atau

lebih molekul konstituen (Mukesh and Rakesh, 2011).

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa senyawa 3-merkaptio-5H-1,2,4-triazino [5,6-b] indole-5-asam asetat adalah inhibitor yang paling menjanjikan, dengan nilai IC₅₀ di daerah submikromolar dengan selektivitas tinggi terhadap aldehid reduktase. Penelitian lain menunjukkan bahwa sebagian besar inhibitor aldosa reduktase mengandung gugus asam, yang menyediakan interaksi ikatan hidrogen dengan sisi aktif enzim yang berisi residu Tyr48, His110 dan Trp111, dan bagian nikotinamid dari NADP⁺.

3. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan menggunakan komputer dengan spesifikasi Acer Aspire 4736 dengan Intel Core2Duo, 1GB RAM dalam lingkungan sistem Windows 7 32bit. Perangkat lunak yang digunakan yaitu PDBest, MarvinSuite, PyRxAutoDock Vina, Open Babel, Chimera, PyMOL dan PLIP.

Tahap Persiapan

Protein target diperoleh melalui www.pdb.org kemudian dilakukan pengolahan terhadap filepdb protein dengan menggunakan PDBest untuk menghilangkan ANISOU. Chimera 1.10.2 digunakan untuk memperoleh file ligan *native* (53N) dan protein target (4yu1). Senyawa obat dilakukan pengolahan ke bentuk 3D dengan bantuan MarvinSuite untuk memperoleh struktur 3D seperti halnya untuk berkas senyawa dataset dan *decoys* yang dikoleksi dari dude.docking.org serta senyawa novel (turunan zerumbon). Senyawa *decoys* yang dimiliki berjumlah 1200 sehingga dilakukan pengolahan dengan Openbabel sehingga diperoleh 50 senyawa *decoys*.

Tahap Docking

Moleculardocking dilakukan dengan menggunakan program PyRx-0.9.4. untuk mencari konformasi terbaik antara ligan *native* 53N, 5 senyawa obat, 40 senyawa dataset, senyawa novel, 50 senyawa *decoys* dengan reseptor 4yu1. Data *bindingaffinity* diperoleh dalam kkal/mol

berikut dengan konformasi terbaik dari masing-masing ligan.

Tahap Pengolahan Data

Perangkat lunak PyMOL digunakan untuk membantu visualisasi interaksi yang terjadi antara ligan-protein. Program PLIP yang didistribusikan secara gratis digunakan mencari jenis interaksi (*hydrogenbonding*, *hydrophobicinteraction*, *phi-phiinteraction*) dari ligan-protein hasil docking.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu metode yang paling sering digunakan pada *structure-baseddrugdesign*(SBDD) adalah *moleculardocking*. Kemampuannya untuk memprediksi dengan tingkat akurasi yang tinggi dan kecepatan konformasi ligan dalam reseptor target menjadi daya tarik tersendiri.

Beberapa kategori pencarian algoritmadocking, yaitu *Rigid-BodyDocking*, *Flexible-LigandDocking* (sistematik, random, dan simulasi molekuler) dan *Flexible-Protein Docking*. Rigid-Body merupakan algoritma yang paling dasar dan tercepat untuk sampel konformasi ruang hal tersebut dikarenakan kategori ini tidak memperhitungkan fleksibilitas konformasi dari ligan maupun protein, sehingga pengambilan data hanya didasarkan pada rotasi/ruang translasi dan saling melengkapi geometrical antara kedua molekul tersebut. *Flexible-LigandDocking* merupakan algoritmaDocking yang paling umum. Protein pada kategori ini dipertimbangkan sebagai suatu *Rigid-Body* dan Fleksibilitas Ligan sebagian maupun penuh dalam proses analisis ruang konformasinya.

Tabel 1. Nilai *bindingaffinity* senyawa yang diujikan terhadap protein 4yu1

Senyawa	Afinitasikatan (kkal/mol)			
	Vina	AD-SA	AD-GA	AD-LGA
<i>Native ligand</i>	-7,0	-2,72	-5,79	-8,91
Inhibitor IDD384	-8,3	-1,4	-6,39	-7,58
Alrestatin	-8,0	-4,39	-6,36	-7,11
Fidarestat	-7,2	-5,04	-6,98	-7,05
Tolrestat	-7,8	-0,9	-5,33	-6,33
Best-dataset-1	-10,4	-5,85	-10,28	-10,56
	(bdb16609)	(bdb16312)	(bdb16671)	(bdb16609)
Best-dataset-2	-10,2	-5,14	-10,14	-10,55
	(bdb16471)	(bdb16456)	(bdb16409)	(bdb16471)
Best-novel-1	-10,0	-6,38	-9,53	-11,2
	(zer17)	(zer12-3b)	(zer09)	(zer17)
Best-novel-2	-9,4	-5,55	-9,08	-10,83
	(zer12-3a)	(zer02)	zer17	(zer11)
Best-decoys-1	-9,2	-6,79	-9,37	-10,41
	(zinc04894385)	(zinc00492465)	(zinc05731337)	(zinc02944779)
Best-decoys-2	-8,9	-5,73	-9,35	-9,53
	(zinc30809470)	(zinc00494038)	(zinc13211758)	(zinc05731337)

Docking menggunakan kategori ini menantang, karena menggunakan pendekatan dengan mengeksplorasi 6 translasi dan derajat rotasi dari kompleks bebas dan juga derajat konformasi dari ligand bebas dan membutuhkan keahlian komputasi. GA dan LGA termasuk dalam kategori ini. Flexible-Protein Docking dalam beberapa studi mengenai docking beberapa protein-ligan yang diterapkan pada kategori ini hanya memberikan hasil yang sukses ketika protein agak kaku dan memiliki struktur 3D yang merepresentasikan konformasi proteinnya,

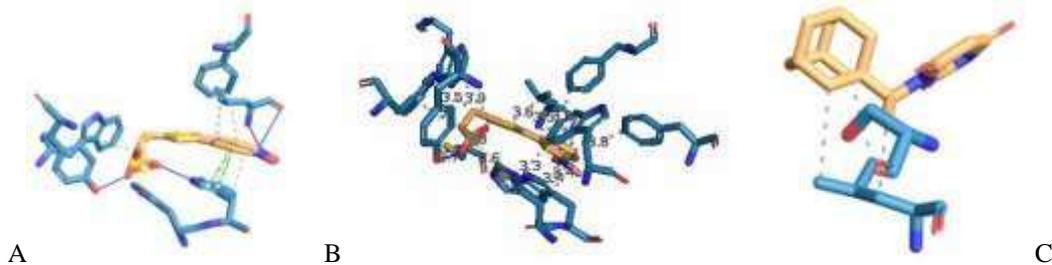
dan SA termasuk dalam kategori ini. (Ramos *etal.*, 2013). Changetal., (2010) menyakan bahwa Vina pada dasarnya dalam proses *docking* menggunakan perhitungan gradien pada saat mencari daerah yang optimal pada gridbox yang telah ditentukan untuk memperoleh data hasil *dockingnya*.

Tabel 1 menunjukkan bahwa keempat senyawa obat yakni Inhibitor IDD384, Alrestatin, Fidarestat dan Tolrestat memiliki afinitas yang lebih baik dari *native ligand* yang ditunjukkan pada metode Vina dan GA. Keempat senyawa obat pada metode LGA

memiliki afinitas yang kurang baik dibandingkan dengan LGA sementara pada algoritma SA, Inhibitor IDD384 dan Tolrestat memiliki afinitas yang kurang baik. Afinitas paling baik terjadi pada Inhibitor IDD384 ketika dilakukan pengerjaan dengan algoritma Vina. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa obat sebagian besar sebenarnya mampu menggantikan ligan *native* 53N untuk berikatan dengan protein 4yu1 sehingga dimungkinkan mampu memberikan alternatif aksi.

Ligan novel yang merupakan senyawa-senyawa yang menurut penelitian terdahulu (Santoso, Hanwar dan Suhendi, 2015) mampu memberikan efek antidiabetik. Hasil penelitian ini melalui *running* algoritma *docking* terhadap novel

ligan diketahui bahwa senyawa ZER17 memberikan muncul sebagai aktivitas terbaik pertama pada algoritma Vina dan LGA, terbaik kedua pada algoritma GA sementara pada algoritma SA tidak muncul. Aktivitas dari *bindingaffinity* ZER17 terhadap protein 4yu1 melalui Vina tidak lebih kuat dibandingkan dengan senyawa dataset namun masih lebih kuat dibandingkan dengan senyawa *decoys*. Pada algoritma GA senyawa ZER17 tidak lebih aktif dibandingkan dengan senyawa dataset maupun *decoys*. Algoritma LGA menunjukkan hasil terbaik dari ZER17 di mana ikatan antara ligan tersebut dengan protein 4yu1 mampu mengalahkan afinitas dari ikatan protein dengan dataset maupun *decoys*.



Gambar 1. Interaksi Ligan *Native* 53N (A) dan ZER17 (B) dengan Protein 4yu1 dengan algoritma LGA, ZINC0588 (C) dengan algoritma SA.

Hal yang menarik adalah pada *running* SA tidak ditemukan senyawa ZER17 dan senyawa *decoys* yang seharusnya lebih inaktif dari senyawa dataset justru menjadi senyawa yang memiliki *bindingaffinity* paling kuat. Senyawa ligan *native* lain yang muncul adalah ZER12-3a, ZER12-3b, ZER02, ZER09, dan ZER11. Kemunculan dari setiap senyawa tersebut hanya terjadi satu kali pada algoritma yang berbeda-beda pula sehingga belum cukup kuat untuk mendefinisikan detail dari aktivitasnya. Hal ini dapat disebabkan bahwa faktor kebetulan yang terjadi cukup tinggi.

Hasil dari PLIP dapat dimanfaatkan untuk mendeskripsikan aktivitas ikatan yang terjadi antara ligan dengan protein 4yu1 dengan melihat interaksi dari asam amino yang terikat. Senyawa ligan *native* 53N secara umum menjelaskan mekanisme

bagaimana suatu ligan dapat terikat pada protein. Ikatan *hydrophobic* dari TRP-20 terjadi pada Vina, SA-Local dan LGA namun tidak ditemukan pada algoritma GA. Ikatan hidrogen dari TRP-111 juga terjadi pada ketiga algoritma tersebut namun tidak ditemukan pada GA. Seharusnya asam amino tersebut ditemukan pula pada algoritma GA karena asam amino tersebut dapat dicurigai sebagai kunci letak dari suatu ligan dapat tertempel pada protein 4yu1.

Ikatan hidrofobik LEU-300 ditemukan pada hampir semua senyawa obat kecuali pada senyawa Fidarestat dan Tolrestat yang di-*running* menggunakan algoritma Vina. Sementara ikatan tersebut hanya ditemukan pada ligan *native* dengan *running* LGA. Oleh karena hal tersebut ikatan LEU-300 tidak benar-benar bisa digunakan untuk mendeskripsikan apakah ikatan tersebut yang

bertanggung jawab atas aktivitas antidiabetik terhadap protein 4yu1.

Ikatan lain yang menarik adalah ikatan hidrofobik pada asam amino PHE-122 yang ditemukan pada Alresatin dan Fidarestat. Ikatan pada asam amino PHE-122 juga ditemukan pada inhibitor IDD384 kecuali *running* dengan SA-Local dan ditemukan pada Tolrestat dengan *running* menggunakan GA dan LGA. Hal ini menunjukkan bahwa secara umum tidak ditemukan pola ikatan pada asam amino pada protein 4yu1 oleh obat-obat antidiabetik.

Hal yang menarik terjadi pada senyawa novel di mana terjadi ikatan hidrofobik dengan asam amino LEU-300. Asam amino LEU-300 juga secara konsisten muncul dengan terikat pada *decoys* dan dataset selain best dataset dengan algoritma SA. Sehingga di sini dicurigai bahwa senyawa LEU-300 menjadi penentu apakah suatu senyawa mampu memberikan suatu aktivitas terhadap protein 4yu1. Residu LEU-300 menjadi pintu dari aktivitas karena merupakan asam amino yang paling sering terikat dengan ligan.

Aktivitas yang menarik lainnya terjadi pada novel ligan yakni ditemukannya ikatan hidrofobik pada TRP-111 yang dimiliki oleh ZER17 (Vina dan LGA) dan ZER09 (GA). Ikatan pada TRP-111 dengan LGA terjadi sebanyak tiga buah, dengan Vina 2 buah dan dengan GA 1 buah. Jumlah ikatan ini menunjukkan korelasi antara banyak ikatan dengan *bindingaffinity* dari ikatan. Semakin banyak ikatan yang terbentuk, *bindingaffinity* yang terjadi juga semakin besar. Asam amino ini juga muncul pada senyawa *decoys* dengan *running* Vina, GA dan LGA. Hampir sama dengan yang terjadi dengan *ligannative*, pada senyawa *decoys* ini menunjukkan bahwa banyak ikatan pada TRP-111 memberikan kenaikan *bindingaffinity* terhadap ligan.

Asam amino TRP-219 dapat digunakan untuk menjelaskan mengenai keaktifan senyawa novel karena hanya muncul oleh senyawa novel pada keempat algoritma. Ikatan pada TRP-219 juga muncul pada dataset (senyawa aktif) selain dari algoritma SA. Sementara pada *decoys* hanya muncul

pengerjaan dengan algoritma GA dan LGA. Namun jumlah ikatan pada TRP-219 tidak dapat menjelaskan hubungan dengan besarnya *bindingaffinity* yang dimiliki.

Ikatan *p-stacking* pada TRP-11 yang terjadi pada *decoys* dengan *running* GA menunjukkan aktivitas yang paling berbeda. Senyawa *decoys* merupakan senyawa inaktif sehingga aktivitasnya tidak menjadi bermakna bagi protein 4yu1. Aktivitas yang berbeda ini dapat diabaikan karena faktor kebetulan yang terjadi cukup besar.

5. SIMPULAN

Senyawa novel ligandakukupmenjanjikanuntukdilakukan percobaanlebihlanjut terhadap 4yu1 walaupun senyawa ZER17 khususnya memiliki aktivitas ikatan yang cukup dekat dengan *ligannative* dari protein 4yu1 dan secara umum tidak lebih aktif dibandingkan senyawa dataset (senyawa yang diketahui aktif). Poladari ikatan juga tidak dapat ditarik generalisasi untuk menggambarkan bagaimana senyawa tersebut dapat memberikan suatu aktivitas.

6. REFERENSI

- Alexiou P., Pegklidou K, Chatzopoulou M., Nicolaou I. and Demopoulos V.J., 2009, Aldose Reductase Enzyme and its Implication to Major Health Problems of the 21st Century, *Current Medicinal Chemistry*, 16, 734-752.
- Antony dan Vijayan. 2015. Identification of Novel Aldose Reductase Inhibitors from Spices: A Molecular Docking and Simulation Study. *PLOS ONE* 10(9): e0138186.
- Ferreira, Leonardo G., Ricardo N. dos Santos, Glaucius Oliva and Andricopulo A.D. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20, 13384-13421.
- Grosdidier A, Zoete V, and Michielin O. 2007. EADock: docking of small molecules into protein active sites with

- a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins*; 67:1010–25
- International Diabetes Federation. 2014. IDF Diabetes Atlas, 6th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, <http://www.idf.org/diabetes-atlas>
- Mukesh B. and Rakesh K. 2011. Molecular Docking: A Review, *IJRAP*. 2 (6) 1746-1751, Jaipur National University, India.
- Ramana K.V. and Srivastava S.K. 2010. Aldose Reductase: A Novel Therapeutic Target for Inflammatory Pathologies. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 42(1): 17–20. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.009
- Stefek M., SoltesovaPrnova M., Majekova M., Rechlin C., Heine A., danKlebe G., 2015, Identification of Novel Aldose Reductase Inhibitors Based on CarboxymethylatedMercapto-Triazino-Indole Scaffold, *J. Medicinal Chemistry.* 58(6):2649-57. doi: 10.1021/jm5015814
- Trott O. and Olson A.J. (2010). AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <http://doi.org/10.1002/jcc.21334>