KAJIAN *IN SILICO* AGONIS PPAR GAMMA-RECEPTOR PROTEIN (5Y2O) SEBAGAI ANTIHIPERGLIKEMIA MENGGUNAKAN DOCK6

IN SILICO STUDY OF AGONISTS OF PPAR GAMMA-RECEPTOR PROTEIN (5Y2O) AS ANTIHIPERGLICEMIA USING DOCK6

[1)]Wanudya Atmajani, [2)] Adnan Buyung Kurniawan, [3)]Ratna Hapsari, [4)]Broto Santoso
[1,2,3,4)]Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. Achmad Yani – Tromol Pos I, Pabelan, Kartasura, Surakarta 57102
*Email: wanudyaa@gmail.com
*Email: broto.santoso@ums.ac.id

ABSTRAK

Diabetes mellitus (DM) tipe 2 merupakan penyakit gangguan metabolisme heterogen yang ditandai dengan hiperglikemia serta adanya resistensi terhadap sekresi insulin. Aktivasi PPARγ meningkatkan penyerapan glukosa dan pemanfaatannya di organ perifer, merangsang penyimpanan asam lemak dalam adiposit, meningkatkan pensinyalan insulin, dan mengurangi glukoneogenesis di hati, sehingga meningkatkan sensitivitas insulin. Aktivitas antihiperglikemia untuk menguji senyawa dapat dilakukan salah satunya dengan molecular docking. Protein target yang digunakan memiliki kode PDB 5Y2O. Preparasi protein dimulai dengan menggunakan UCSF Chimera. Proses docking dilakukan menggunakan software DOCK6 dengan metode fleksibel dan rigid. Interaksi ligan dengan protein target divisualisasikan secara 3D dengan PyMol dan visualisasi interaksi ligan dengan protein target menggunakan PLIP. Hasil grid score ligan natif (8N6) yang diperoleh untuk metode fleksibel adalah -42,37kkal/mol dan untuk metode fleksibel adalah -42,03 kkal.mol. Didapat dua ligan uji terbaik untuk masing-masing metode. Ligan uji terbaik dengan metode fleksibel adalah 4147757 dan 2523552, keduanya memiliki grid score berturut-turut -47,64 dan -47,44 kkal/mol. Ligan uji terbaik dengan metode rigid adalah 71751677 dan 71751678, keduanya memiliki grid score -46,85kkal/mol. Ligan uji dikatakan memiliki aktivitas yang lebih baik dari ligan natif bila nilai grid score ligan uji semakin negative daripaa nilai grid score ligan natif, semakin negatif nilai dari grid score maka semakin sedikit energi yang dibutuhkan ligan untuk berikatan dengan protein target, sehingga ligan akan mudah berikatan dengan protein target. Dua ligan uji terbaik dari masing-masing metode memiliki grid score lebih negatif daripada ligan natif pada masing-masing metode. Hasil visualisasi interaksi ligan didapatkan adanya interaksi antara ligan dan protein target. Interaksi yang ada didalamnya adalah interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen, adapun untuk ligan dengan metode fleksibel terdapat interaksi Phi-Cation.

Kata Kunci *: antidiabetes, 5Y2O, docking molekular, PPAR gamma.*

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous metabolic disorder characterized by hyperglycemia and resistance to insulin secretion. PPAR activation increases glucose absorption and utilization in peripheral organs, stimulates fatty acid storage in adipocytes, increases insulin signaling, and reduces gluconeogenesis in the liver, thereby increasing insulin sensitivity. Antihiperglicemia activity to test compounds can be done by molecular docking. The target protein used has a PDB code 5Y2O. Protein preparation begins using UCSF Chimera. The docking process is done using DOCK6 software with a flexible and rigid method. The interaction of ligands with target proteins was visualized in 3D with PyMol and visualization of ligand interactions with target proteins using PLIP. The grid results of the native ligand score (8N6) obtained for the flexible method are -42.37 kcal / mol and for the flexible method is -42.03 kcal/mol. There are two of the best test ligands for each method. The best test ligands with flexible methods are 4147757 and 2523552, both of which have a grid score of -47.64 and -47.44 kcal / mol respectively. The best test ligand with rigid method is 71751677 and 71751678, both of them have a grid score of -46.85 kcal / mol. Test ligands are said to have better activity than the negative ligand if the test ligand grid score value is more negative than the negative ligand grid score, the more

negative the value of grid score, the less energy the ligand needs to bind to the target protein with target proteins. The two best test ligands from each method have more negative grid scores than the negative ligands in each method. The results of the visualization of ligand interactions obtained an interaction between ligands and target proteins. The interactions inside are hydrophobic interactions and hydrogen bonds, while for ligands with flexible methods there are Phi-Cation interactions.

***Keywords**: antidiabetic, 5Y2O, molecular docking, PPAR gamma.*

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan sekelompok gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan kelainan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (Wells, DiPiro, Schwinghammer, & DiPiro, 2015). Jumlah penderita diabetes mellitus di dunia pada tahun 2015 sebesar 415 juta pasien, dan diperkirakan jumlah itu akan meningkat menjadi 642 juta pasien pada tahun 2040. Indonesia menduduki peringkat ke-tujuh di dunia untuk prevalensi penderita diabetes tertinggi di dunia. Diabetes dengan komplikasi merupakan penyebab kematian tertinggi nomor tiga di Indonesia. Persentase kematian akibat diabetes mellitus di Indonesia merupakan tertinggi kedua di dunia (World Health Organization, 2016). Diabetes mellitus terdiri dari dua tipe, yaitu DM Tipe 1 dan DM Tipe 2. DM Tipe 1 dapat terjadi karena rusaknya sel β pankreas sebagai penghasil insulin, maka sekresi insulin tdak terjadi atau insuli hanya tersekresi sedikit. Kerusakan sel β pankreas ini terjadi karena adanya inflamasi pada pankreas. DM tipe 2 terjadi karena resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Resistensi insulin dimanifestasikan oleh peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas, peningkatan produksi glukosa hati, dan penurunan penyerapan otot rangka glukosa (Wells et al., 2015). Kedua penyebab DM Tipe 2 ini diperparah dengan terjadinya hiperglikemia. Hiperglikemia yang terjadi dari waktu ke waktu dapat menyebabkan kerusakan dari berbagai sistem tubuh khususnya saraf dan pembuluh darah. Salah satu cara untuk mengatasi hiperglikemia adalah pemberian terapi antihiperglikemia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014)

Salah satu obat antihiperglikemia untuk terapi DM tipe 2 adalah golongan thiazolidinedione, contoh obat dari golongan ini adalah Pioglitazone. Golongan thiazolidinedione bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin dalam jaringan otot, hati, dan lemak(Wells et al., 2015). Thiazolidinediones adalah senyawa yang bertindak sebagai agonis dari *peroxisome proliferator-activated reseptor-gamma* (PPARγ), yang dapat meningkatkan sensibilitas jaringan (otot, jaringan adipositas, dan hati) terhadap aksi insulin. Aktivasi PPARγ meningkatkan penyerapan glukosa dan pemanfaatannya di organ perifer, merangsang penyimpanan asam lemak dalam adiposit, meningkatkan pensinyalan insulin, dan mengurangi glukoneogenesis di hati. Ketika diaktifkan oleh ligan, seperti thiazolidinedione, PPARϒ berikatan dengan reseptor asam retinoat 9-cis (reseptor RXR [retinoid X]) untuk membentuk heterodimer. Ikatan ini dapat membuat DNA mengatur transkripsi genetik dan terjemahan berbagai protein terlibat dalam diferensiasi sel dan metabolisme glukosa dan lipid (Drugbank, 2019; Greenfield & Chisholm, 2004; Wells, DiPiro, Schwinghammer, & DiPiro, 2015)

Aktivitas antihiperglikemia dari suatu senyawa dapat diuji secara *in silico* dengan *molecular docking*. *Molecular docking* adalah suatu pemodelan komputasi dari struktur komplek yang terdiri dari dua atau lebih molekul yang saling berinteraksi dan hasilnya nilai yang dapat menggambarkan energi ikatan total (Guedes, de Magalhães, & Dardenne, 2014). Tujuan dari dilakukannya penelitian dengan *molecular docking* ini untuk mendapatkan senyawa obat yang lebih baik dari senyawa obat sebelumnya. Ligan yang

dipakai pada penelitian ini adalah ligan 8N6 atau pioglitazone sedangkan protein yang akan di-*docking* adalah protein dengan PDB ID 5Y2O. Ligan dan protein diuji kekuatan ikatanya kemudian hasilnya dibandingkan dengan kekuatan ikatan ligan asli protein dan ligan pembanding.

METODE

Alat

Perangkat Komputer dengan spesifikasi Intel Core i3-4030U berkecepatan 1.9 GHz RAM 2GB dan penyimpanan Harddisk 500GB, UCSF Chimera 1.10, DOCK6, Edit Plus 4.0.631, PLIP (*Protein Ligand Interaction Profiler*), Open Babel GUI Portabel 64-bit, dan PyMOL 1.7.2.1. Protein target yang digunakan memiliki kode PDB ID 5Y2O yang diperoleh dari rscb.org, dengan resolusi kristalografi 1,801 Amstrong. Ligan natif yang dipakai adalah ligan 8N6.

Langkah Pengerjaan

Pencarian target pada rcsb.org didapatkan target protein 5Y2O dan ligan natif 8N6. Preparasi protein dimulai dengan memasukkan protein target 5Y2O ke aplikasi UCSF Chimera untuk menghilangkan residu dan menyisakan ligan. Dilakukan penghilangan H dan penambahan muatan. Selanjutnya diteruskan pada proses Molecular Docking menggunakan aplikasi DOCK6. Langkah selanjutnya validasi metode docking menggunakan DOCK6. Selanjutnya, dilakukan docking molekular terhadap semua senyawa menggunakan Dock6 dengan 2 metode, yaitu metode fleksibel dan rigid. Setalah itu dianalisis hasil dari *docking* tersebut, yaitu *grid score* yang kemudian dibandingkan antara ligan uji dengan ligan *native*. Visualisasi dilakukan dengan menyisakan satu model ligan terbaik dari tiap molekul menggunakan EditPlus. Visualisasi 3D dan interaksi ligan-protein dapat dilihatkan dengan aplikasi PyMOL dan interaksi 2D dapat dilihat dengan PLIP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelusuran protein target pada database *pdb.org*, didapatkan hasil salah satu protein target yang berperan sebagai agonis kuat dan selektif untuk reseptor aktif peroksisom proliferator ɣ (PPAR- ɣ) sehingga dapat meningkatkan aksi kerja insulin dan memperbaiki pasien hiperglikemia (Lee *et al*, 2017). Protein target tersebut adalah 5Y2O, dan pada penelitian ini, protein tersebut dijadikan target *molecular docking*. Protein dipilih berdasarkan hasil X-ray kristalografi dengan resolusi kurang dari 2,5 Amstrong, karena pada resolusi tersebut, protein tidak banyak bergerak sehingga hasil uji secara in silico tidak jauh beda dengan hasil uji secara in vitro dan in vivo (Santoso et al, 2015). Protein target 5Y2O, memiliki resolusi sebesar 1,801 Amstrong yang diperoleh dari sumber organisme *Homo sapiens*. Terdapat dua rantai pada protein ini yaitu rantai A dan rantai B, dipilih rantai A sebab terdapat ligan dalam strutur kompleksnya. Ligan tersebut memiliki kode PDB 8N6, dengan nama (5S)-5-[[4-[2-(5-ethylpyridin-2-yl)ethoxy]phenyl]methyl]-1,3-thiazolidine-2,4-dione (Knox *et al.,* 2011).

Proses preparasi protein target dengan menggunakan Chimera, preparasi dimulai dari pemisahan protein dengan ligannya, dengan tujuan untuk mendapatkan tiga molekul protein, untuk dihitung dengan DOCK6. Tiga molekul tersebut adalah, molekul protein yang tidak memiiki muatan, molekul protein tanpa atom hidrogen, dan *surface molecular* protein. Selain preparasi protein target, dilakukan preparasi terhadap ligan 8N6. Ligan 8N6 ditambahkan muatan agar dapat berinteraksi dengan protein secara optimum dan ditambahkan atom hidrogen agar ligan dapat mirip dengan bentuk ligan aslinya (Santoso et al., 2015). Keseluruhan ligan uji berjumlah 58 molekul yang didapat dari *rscb.org*.

Setelah preparasi dilakukan, dilakukan validasi metode *docking*, yang dilakukan dengan cara menghitung nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD)

antara ligan natif 8N6 dan protein 5Y2O. Pada validasi metode *docking* di DOCK6 terdapat dua metode interaksi ligan natif-protein yang digunakan yaitu metode fleksibel dan metode rigid. Metode interaksi ligan-protein secara rigid merupakan perpindahan posisi 3D yang dilakukan molekul secara keseluruhan, sedangkan fleksibel didapat dari ligan terhadap protein yang rigid. Validasi ini dilakukan untuk mengetahui bahwa sistem *molecular docking* bisa mendapatkan hasil yang mendekati konformasi ligan hasil kristalografi (Santoso et al., 2015).

Hasil validasi metode docking dengan DOCK6, mendapatkan hasil nilai RMSD untuk ligan natif 8N6 dengan protein 5Y2O adalah 11,1209 untuk metode fleksibel, dan 0,4158 untuk metode rigid. Hasil tersebut ditunjukkan pada Tabel 1. Validasi metode *docking* dapat diterima, bila nilai RMSD kurang dari 5, untuk metode fleksibel maupun rigid. Jika nilai RMSD semakin kecil, maka ligan hasil *docking* semakin mirip posisinya dengan ligan hasil kristalografi (Santoso et al., 2015).

Tabel 1 Nilai RMSD ligan 8N6 (natif) terhadap protein 5Y2O dengan metode Fleksibel dan Rigid dengan DOCK6

Kode Ligan	Protein Target	Metode	Nilai RMSD
8N6 (native)	5Y2O	Fleksibel	11,1209
8N6 (native)	5Y2O	Fleksibel	0,4158

Tabel 2 Nilai RMSD 2 ligan uji terbaik dari metode Fleksibel dan Rigid terhadap Protein 5Y2O dengan DOCK6

Kode Ligan	Protein Target	Metode	Nilai RMSD
4147757	5Y2O	Fleksibel	89,9422
25235523	5Y2O	Fleksibel	89,9854
71751677	5Y2O	Rigid	90,391
71751678	5Y2O	Rigid	90,391

Hasil dari *molecular docking* berupa *Grid Score, grid score* adalah energi yang dibutuhkan oleh ligan untuk berikatan dengan protein, semakin negatif nilai dari *grid score* maka semakin sedikit energi yang dibutuhkan ligan untuk berikatan dengan protein target, sehingga ligan akan mudah berikatan dengan protein target (Rahman dan Santoso, 2018). Dari 58 molekul yang di-*docking*, dipilih dua ligan uji terbaik dengan nilai *grid score* yang lebih negatif dari *grid score* ligan uji, baik dari metode fleksibel atau rigid . dua ligan uji terbaik dari metode fleksibel adalah ligan dengan kode 4147757 dan 25235523, sedangkan dua ligan uji terbaik dari metode rigid adalah ligan uji dengan kode 71751577 dan 71751678. Keempat ligan uji tersebut, dihitung nilai RMSD-nya juga, didapatkan hasil bahwa keempat ligan uji tersebut memiliki nilai di atas 5 (Tabel 2).

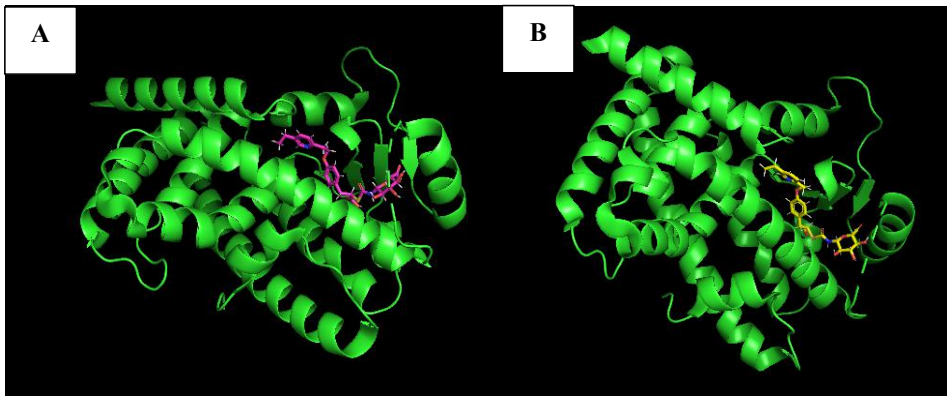
Tabel 3 Nilai *grid score* ligan natif 8N6 dan 2 ligan uji terbaik dari metode fleksibel dan rigid terhadap protein target 5Y2O dengan DOCK6

Kode Ligan	Protein Target	Metode	Grid Score (kkal/mol)
8N6 (*native*)	5Y2O	Fleksibel	-42,37
4147757	5Y2O	Fleksibel	-47,64
25235523	5Y2O	Fleksibel	-47,44
8N6 (*native*)	5Y2O	Rigid	-42,03
71751677	5Y2O	Rigid	-46,85
71751678	5Y2O	Rigid	-46,85

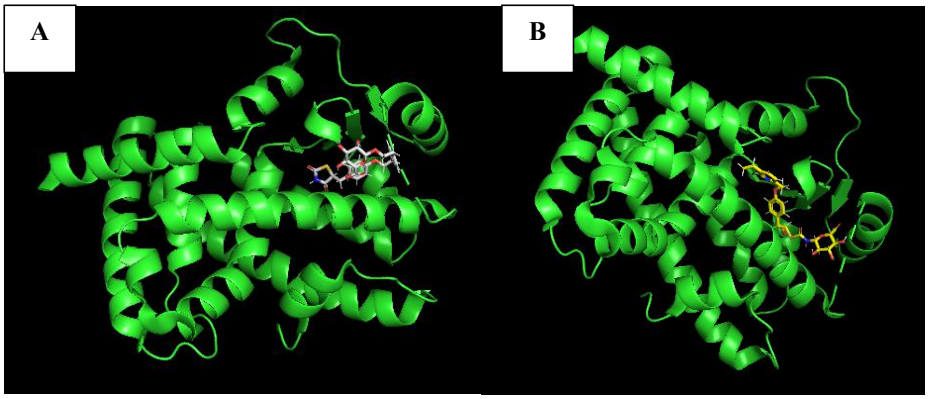
Hasil *grid score* dari 2 ligan uji terbaik dari masing-masing metode ditampilkan pada Tabel 3. Hasil metode fleksibel, menunjukkan adanya interaksi yang baik antara grup ligan uji yaitu ligan 4147757 dan 25235523, terhadap protein target 5Y2O, dibandingkan ligan natifnya. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai *grid score* kedua ligan uji tersebut lebih negatif dibanding *grid score* ligan natifnya. Hasil dari metode rigid menunjukkan dua ligan 71751677 dan 71751678 memiliki *grid score* yang sama dan nilai *grid score*-nya lebih negatif dibanding *grid score* ligan natif.

Interaksi ligan dengan protein target divisualisasikan secara 3D dengan PyMol (Gambar 1 dan Gambar 2) dan menggunakan PLIP (Gambar 3dan Gambar 4). Visualisasi aktivitas *docking molecular* digunakan untuk mengetahui interaksi residu-residu antara ligan uji dan protein target. PLIP juga digunakan untuk melihat residu yang terlibat

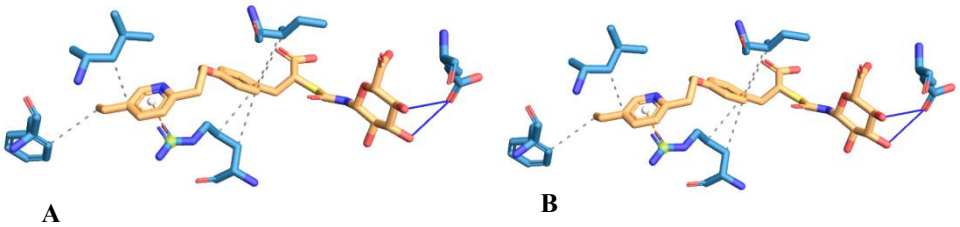
Gambar 1. Visualisasi 3D interaksi ligan uji 4147757 terhadap protein target 5Y2O (a) dan ligan uji 25235523 dengan protein target 5Y2O (b), menggunakan aplikasi PyMol pada metode Fleksibel



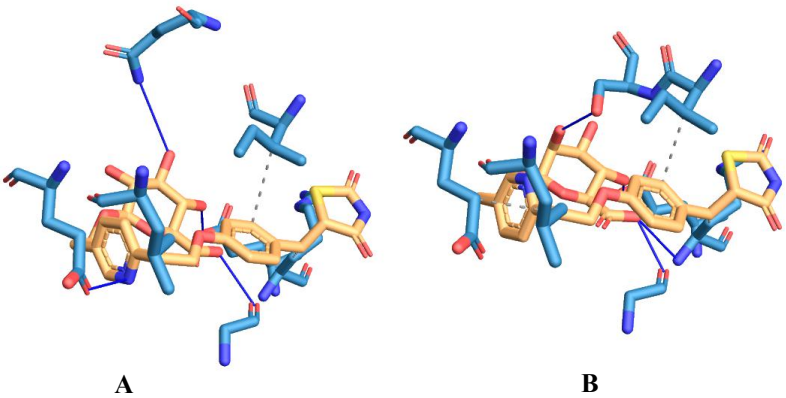
Gambar 2. Visualisasi 3D interaksi ligan uji 71751677 dengan protein target 5Y2O (a) dan ligan uji 71751678 dengan protein target 5Y2O, menggunakan aplikasi PyMol, pada metode Rigid



Gambar 3. Konformasi 3D hasil visualisasi oleh PLIP pada ligan uji 4147757 dengan protein target 5Y2O (a) dan ligan 25235523 dengan protein target 5Y2O (b), menggunakan metode Fleksibel



Gambar 4. Konformasi 3D hasil visualisasi oleh PLIP pada ligan uji 71751677 dengan protein target 5Y2O (a) dan ligan 71751678 dengan protein target 5Y2O (b), menggunakan metode Rigid



Tabel 4 Interaksi ligan-protein beserta residu yang berperan

Kode Ligan	Metode	Tipe Ikatan	Residu
4147757	Fleksibel	Hydrophobic Interaction	226A PHE, 228A LEU, 288A ARG, 341A ILE
		Hydrogen Bond	259A GLU
		Phi Cation Interaction	288A ARG
25235523	Fleksibel	Hydrophobic Interaction	226A PHE, 228A LEU, 288A ARG, 341A ILE
		Hydrogen Bond	259A GLU
		Phi Cation Interaction	288A ARG
71751677	Rigid	Hydrophobic Interaction	255A LEU, 288A ARG, 341A ILE
		Hydrogen Bond	259 GLU, 284A GLY, 291A GLU, 345A GLN
71751678	Rigid	Hydrophobic Interaction	255A LEU, 259A GLU, 288A ARG, 341A ILE
		Hydrogen Bond	284A GLY, 288A, 291A GLU, 342A SER

Visualisasi interaksi antara ligan dan protein target membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen pada motede rigid. Interaksi ligan-protein dengan metode fleksibel terdapat interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan Phi-Cation (Tabel 4).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari *docking molecular* ini, nilai hasil *grid score* ligan natif (8N6) yang diperoleh untuk metode fleksibel adalah -42,37kkal/mol dan untuk metode fleksibel adalah -42,03 kkal.mol. Didapat dua ligan uji terbaik untuk masing-masing metode. Ligan uji terbaik dengan metode fleksibel adalah 4147757 dan 2523552, keduanya memiliki grid score berturut-turut -47,64 dan -47,44 kkal/mol. Ligan uji terbaik dengan metode rigid adalah 71751677 dan 71751678, keduanya memiliki *grid score* -46,85kkal/mol. Untuk hasil visualisasi didapatkan adanya interaksi antara ligan dan protein target. Interaksi ligan-protein pada metode rigid, terdapat interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen, adapun untuk interaksi ligan-protein dengan metode fleksibel terdapat interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen Phi-Cation.

DAFTAR PUSTAKA

Drugbank. (2019). Thiazolidinediones. Retrieved February 27, 2019, from https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002198

Greenfield, J. R., & Chisholm, D. J. (2004). Thiazolidinediones - mechanisms of action. *Australian Prescriber*, *27*(3), 67–70.

Guedes I.A., de Magalhães C.S. and Dardenne L.E. (2014). Receptor-ligand molecular docking, *Biophysical Reviews, 6 (1), 75–87*

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2014). *Infodatin: Situasi dan Analisis Diabetes*. Jakarta.

Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS. (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res*, *39, 35-41.* doi: 10.1093/nar/gkq1126

Lee, M.A., Tan, L., Yang, H., Im, Y.G., Im, Y.J. (2017). Structures of PPAR gamma complexed with lobeglitazone and pioglitazone reveal key determinants for the recognition of antidiabetic drugs. *Scientific Reports, 7, 16837-16837*. 10.1038/s41598-017-17082-x.

Santoso, B., Hanwar, D., & Suhendi, A. (2015) Predikasi 3D Molekular Aktivitas Turunan Senyawa Polihidroksi Zerumbon terhadap Glikogen Sintase Kinase-3 Beta (GSK-3) Menggunakan DOCK6. *2nd Univ. Res. Coloquium*. 1–7.

Rahman, A., & Santoso, B. (2018). Uji Aktivitas Antituberkulosis Senyawa Alam Daun Jeruk Keprok (Citrus reticulata) dan Adas Bintang (Anisi stellati) terhadap reduktoisomerase 1-deoksi-D-ksilulosa-5-fosfat dengan Metode Komputasi Docking Molekuler. Proceeding of The URECOL, 182-187.

Wells, B. G., DiPiro, J. T., Schwinghammer, T. L., & DiPiro, C. V. (2015). *Pharmacotherapy Handbook* (9th ed.). McGraw-Hills.

World Health Organization. (2016). *Diabetes: Fakta dan Angka*. World Health Organization