

DOCKING MOLEKULER β -SITOSTEROL DENGAN PROTEIN DIPEPTIDYLPEPTIDASE-4 (DPP-4) SEBAGAI ANTIHEPERGLIKEMIA SECARA *IN SILICO*

Ni Putu Wahyudewi Primananda, Mutiarani Dasha Hanggaresty, Agus Adi Purnama
Putra³, Ni Kadek Warditiani*

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas
Udayana, Jimbaran, Bali-Indonesia

*kadektia@unud.ac.id

ABSTRAK: Diabetes mellitus adalah kelainan multisistem yang menyebabkan kondisi hiperglikemia dan kelainan metabolik lainnya. *Dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4) adalah salah satu reseptor target dalam pengobatan diabetes. Enzim ini yang terlibat dalam degradasi *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) dan *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP), maka penghambatan enzim DPP-4 dapat memperpanjang kerja GLP-1 dan GIP yang secara langsung meningkatkan tingkat insulin yang dilepaskan. Sehingga, dapat menurunkan kadar glukosa darah oleh insulin yang dimediasi oleh mekanisme transport glukosa sel. Senyawa bahan alam yang berhasil diisolasi dan dilaporkan memiliki aktivitas anti-diabetes salah satunya adalah β -Sitosterol pada tanaman Cemcem (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz). Proses docking menghasilkan nilai energi ikatan antara senyawa uji dengan protein target. Energi ikatan menunjukkan afinitas β -Sitosterol pada protein target. Semakin negatif energi ikatan yang diperoleh, ikatan yang terbentuk antara β -Sitosterol dengan protein target akan semakin stabil. Nilai energi ikatan yang diperoleh pada β -Sitosterol dan Vildagliptin dengan protein NAG berurut-turut sebesar -8,96 kkal/mol dan -748 kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa β -Sitosterol dengan protein target enzim DPP-4 NAG memiliki ikatan yang lebih stabil dibandingkan dengan *native ligand* dengan Vildagliptin. Sehingga, β -Sitosterol berpotensi sebagai antihiperglikemia melalui mekanisme penghambatan aktivitas enzim DPP-4.

Kata kunci: Tanaman cemcem (*Spondias pinnata*); *Dipeptidyl peptidase-;* β -Sitosterol; vildagliptin; anti-diabetes; docking molekuler

ABSTRACT: Diabetes mellitus is a multisystem disorder that causes hyperglycemia and other metabolic disorders. *Dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4) is one of the target receptors in the treatment of diabetes. This enzyme is involved in the degradation of *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) and *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP). The inhibition of the DPP-4 enzyme can prolong the action of GLP-1 and GIP which directly increases the level of insulin released. Thus, it can lower blood glucose levels by insulin which is mediated by the cell glucose transport mechanism. One of the natural compounds that have been isolated and reported to have anti-diabetic activity is β -sitosterol in the Cemcem (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) plant. The docking process produces a bond energy value between the test compound and the target protein. The bond energy shows the affinity of β -sitosterol to the target protein. The more negative the bond energy obtained, the more stable the bonds formed between β -Sitosterol and the target protein. The bond energy values obtained for β -Sitosterol and Vildagliptin with the NAG protein are down to -8.96 kcal/mol and -748 kcal/mol. This shows that β -sitosterol with the DPP-4 NAG enzyme target protein has a more stable bond compared to the native ligand with Vildagliptin. Thus, β -sitosterol has the potential as an antihyperglycemia by inhibiting the activity of the DPP-4 enzyme.

Keywords: *Spondias pinnata* plant; Dipeptidyl peptidase-4; β -Sitosterol; vildagliptin; anti-diabetics; molecular docking.

1. PENDAHULUAN

Penyakit tidak menular menjadi penyebab kematian nomor satu di dunia (63,50%). Menurut data yang dihimpun *International Diabetes Federation* (IDF) 2019, saat ini diperkirakan 463 juta (9,3%) penduduk dunia didiagnosis menyandang Diabetes Mellitus (DM) dan diperkirakan akan terus meningkat sebanyak 578 juta (10,2%) ditahun 2030 [1]. Potensi obat bahan alam juga terus dikembangkan sebagai salah satu manajemen alternatif dalam penanganan diabetes melitus khususnya dalam mengatasi kondisi hiperglikemia. Diabetes mellitus adalah kelainan multisistem yang menyebabkan kondisi hiperglikemia dan kelainan metabolik lainnya. Stress oksidatif yang dipicu oleh hiperglikemia dapat menyebabkan disfungsi sel beta pankreas, serta menyebabkan kerusakan sel lainnya pada penderita diabetes melitus. Beberapa reseptor yang ditargetkan dalam pengobatan diabetes melitus tipe 2 meliputi; *glikogen fosforilase*, *protein tirosin fosfatase 1-beta* (PTP-1 β), *Dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4), *glukokinase*, *peroksisom reseptor aktif proliferasi* (PPAR- γ), *reduktase aldosa* (AR), *reseptor insulin* (IR) [2].

Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4) adalah enzim yang terlibat dalam degradasi *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) dan *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP), maka penghambatan enzim DPP-4 dapat memperpanjang kerja dan aksi dari GLP-1 dan GIP yang secara langsung meningkatkan tingkat insulin yang dilepaskan. Sehingga, dapat menurunkan kadar glukosa darah oleh insulin yang dimediasi oleh mekanisme transport glukosa sel [3]. Hal ini menjadikan DPP-4 sebagai target reseptor yang potensial untuk pengembangan obat diabetes mellitus tipe 2.

Salah satu obat yang digunakan sebagai inhibitor DPP-4 adalah vildagliptin. Vildagliptin adalah agen inhibitor DPP-4

yang biasanya dikombinasikan dengan metformin dalam terapi diabetes mellitus tipe 2. Namun, vildagliptin memiliki efek samping seperti nasofaringitis, sakit kepala, pusing, konstipasi, dispepsia, dan hipertensi [4]. Senyawa bahan alam yang berhasil diisolasi dan dilaporkan memiliki aktivitas anti-diabetes salah satunya adalah β -*Sitosterol* pada tanaman Cemcem (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz). Namun, mekanisme kerja dari β -*Sitosterol* antihiperglikemia pada tanaman Cemcem (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) belum diselidiki lebih lanjut [5]. Sehingga perbandingan vildagliptin dengan senyawa β -*Sitosterol* dalam uji *in silico* ini diharapkan mampu menjadi tolak ukur batu loncatan untuk pengembangan obat baru diabetes mellitus tipe 2 dari bahan alam yang efektif dan tidak memiliki efek samping.

2. PERCOBAAN

2.1 Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan seperangkat komputer dengan spesifikasi *Windows 10 32bit* dengan program *Hyperchem 8* yang digunakan untuk optimasi senyawa β -*Sitosterol Chimera 1.11.1* yang digunakan untuk preparasi protein target, dan aplikasi *AutoDockTools 1.5.6* yang dilengkapi dengan program *Autodock 4* dan *Autogrid4* yang digunakan untuk docking molekuler.

Penelitian ini menggunakan bahan berupa struktur 3 dimensi dari senyawa β -*Sitosterol* dan vildagliptin dengan yang diunduh dari <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Struktur protein target, enzim DPP-4 (PDB ID:1J2E) diunduh dari <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.dod>.

2.2 Prosedur Kerja

a. Preparasi Protein

Preparasi enzim β -*Sitosterol* dilakukan dengan memisahkan protein dengansenyawa *native ligandnya*. Preparasi

protein target enzim DDP-4 dilakukan menggunakan *software Chimera 1.11.1*.

b. Validasi Metode Molecular Docking

Validasi metode docking molekuler dilakukan dengan men-*docking*-kan kembali *native ligand* pada protein target yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program *Autodock tools 1.5.6*. Parameter validasi yang digunakan adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Distance*) <3 Å. Nilai tersebut menunjukkan protokol diterima dan docking dapat dilakukan.

c. Optimasi Struktur 3D β -Sitosterol dan Vildagliptin

Struktur 3D β -Sitosterol dan vildagliptin yang telah diunduh kemudian dioptimasi menggunakan *Hyper Chem 8*. Optimasi dilakukan pada senyawa beserta dengan atom hidrogennya. Optimasi dilakukan dengan melakukan kalkulasi *singlepoint* dan geometri optimasi.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Optimasi Struktur 3D Senyawa Uji

Struktur 3D β -Sitosterol dan vildagliptin dioptimasi menggunakan program Hyperchem 8 dengan metode kalkulasi semi empiris pada model AM1 (Austin model 1). Keunggulan dari kalkulasi semi empiris yakni memerlukan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan *ab initio*. Model AM1 merupakan model yang sangat akurat karena parameter-parameter yang diperhitungkan meliputi total energi, sifat elektronik, pembentukan panas dan geometri optimasi [6] sehingga hasil pemodelan AM1 memiliki karakteristik senyawa hasil optimasi lebih mendekati senyawa sintesis [7]. Pada proses optimasi, dilakukan kalkulasi *single point* dan optimasi geometri untuk memperoleh struktur 3D β -Sitosterol dan vildagliptin yang paling stabil dengan energi total terendah. Hasil dari optimasi struktur β -Sitosterol pada kalkulasi *Single Point* dan optimasi geometri ditunjukkan pada

d. Molekuler Docking β -Sitosterol dan Vildagliptin pada Protein Target

Docking dilakukan dengan menggunakan program *Autodock 4.2*. Senyawa yang dianalisis didockingkan pada protein target enzim DPP-4 yang telah dipreparasi. Hasil dari docking molekuler adalah konformasi senyawa dalam berikatan dengan protein target yang memiliki energi ikatan terendah.

e. Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan hasil energi ikatan yang dihasilkan dari hasil *molecular docking*. Nilai energi ikatan menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa uji dengan reseptor. Semakin rendah energi ikatan, maka semakin kuat ikatan antara senyawa dengan reseptor. Interaksi yang terjadi antara β -Sitosterol dan vildagliptin dengan protein target enzim DPP-4 dapat dilihat dari jenis ikatan yang terbentuk antara β -Sitosterol dan vildagliptin dengan protein target.

Gambar 1. Hasil dari optimasi struktur Vildagliptin pada kalkulasi *Single Point* dan optimasi geometri ditunjukkan pada Gambar 2.

Besar energi total hasil kalkulasi *single point* β -Sitosterol sebesar -7661,818484 kkal/mol sedangkan vildagliptin sebesar -3698,748536 kkal/mol. Setelah dilakukan optimasi geometri terjadi penurunan energi struktur, yaitu energi β -Sitosterol sebesar -7885,1742 kkal/mol dan pada vildagliptin sebesar -5096,3198 kkal/mol. Optimasi senyawa ditunjukkan dengan terjadinya penurunan energi total senyawa. Nilai energi hasil optimasi semakin rendah menunjukkan senyawa tersebut memiliki interaksi berupa gaya tarik antar atom yang semakin besar sedangkan gaya tolak antar atom menjadi semakin minimum sehingga konformasi senyawa yang diperoleh semakin stabil [6].

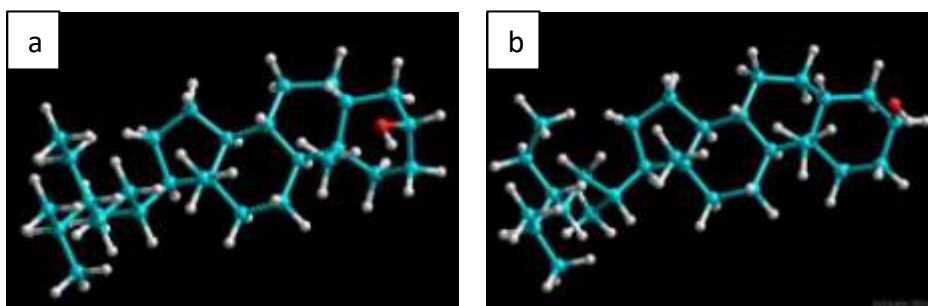
3.2 Preparasi Struktur 3D Protein Target

Preparasi dilakukan terhadap struktur 3D protein target yaitu *Dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4). Preparasi bertujuan untuk memisahkan struktur protein dengan *native ligand* sehingga diperoleh struktur protein target tanpa *native ligand* dan struktur *native ligand*. Pemilihan protein target dilakukan berdasarkan kesesuaian nama dan fungsi protein target. Protein target yang akan digunakan juga harus mengandung *native ligand* dengan aktivitas inhibisi terhadap protein target. Pada penelitian ini dipilih protein target dengan PDB ID-nya masing-masing yaitu *Dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4) [PDB ID :1J2E] yang diunduh pada <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> dalam format .pdb

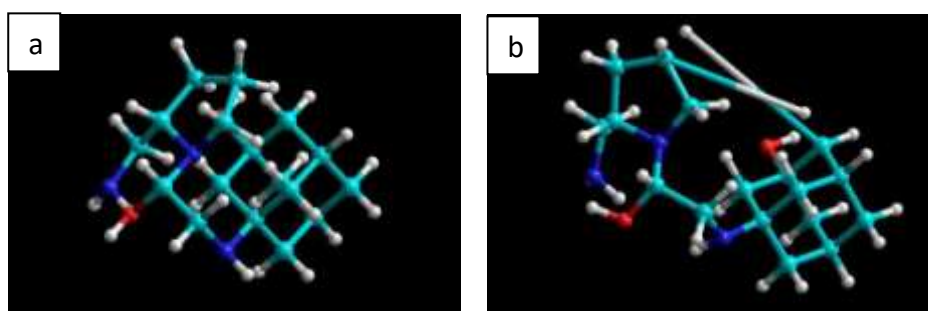
Protein target yang telah dipilih terdiri dari beberapa rantai dan telah memiliki *native ligand*. Protein DPP-4 dengan PDB ID :1J2E memiliki 1 rantai yaitu rantai A. Rantai tersebut memiliki *native ligand* yaitu NAG dengan rumus molekul $C_8 H_{15} NO_6$. NAG memiliki aktivitas sebagai inhibitor β -Sitosterol [5].

Preparasi protein target enzim DPP-4 pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan program Chimera 1.11.1. Preparasi protein target diawali dengan pemilihan satu rantai dari protein target yang mengandung *native ligand*, kemudian dilakukan pemisahan *native ligand* dari rantai protein target yang telah dipilih. Pemilihan rantai protein target enzim DPP-4 ini didasarkan pada letak berikatannya *native ligand* yang memiliki aktivitas inhibisi terhadap protein target. Pemilihan satu rantai pada proses preparasi protein bertujuan untuk memudahkan dalam penentuan koordinat *binding site* sebagai tempat senyawa uji berikatan saat di-docking-kan.

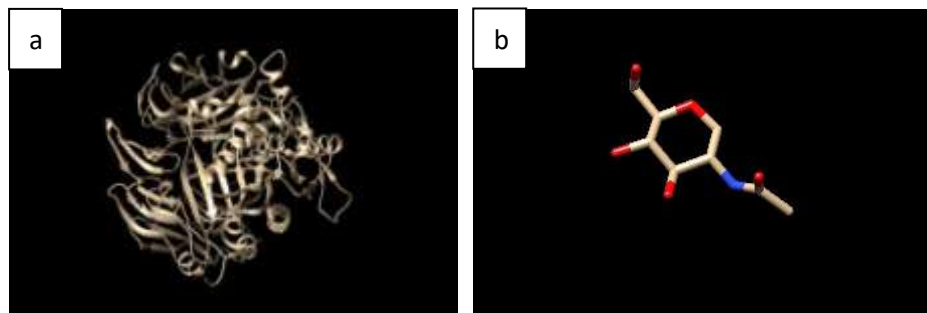
Tahapan selanjutnya dari proses preparasi protein target adalah penghilangan molekul air (H_2O) pada masing-masing protein target yang telah dihilangkan *native ligand*-nya. Tujuan menghilangkan molekul air tersebut agar hanya asam amino pada protein target yang berinteraksi dengan senyawa uji [8]. Proses preparasi protein target enzim DPP-4 akan



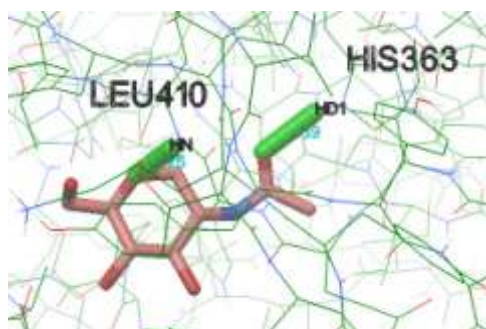
Gambar 1. (a) Struktur tiga dimensi β -Sitosterol teroptimasi pada kalkulasi *single point*; (b) struktur tiga dimensi β -Sitosterol teroptimasi pada optimasi geometri



Gambar 2. (a) Struktur tiga dimensi vildagliptin teroptimasi pada kalkulasi *single point*; (b) struktur tiga dimensi vildagliptin teroptimasi pada optimasi geometri



Gambar 3. (a) Protein DPP-4 Rantai A Tanpa *Native ligand*; (b) *Native ligand* NAG.



Gambar 4. Visualisasi interaksi antara β -Sitosterol dengan *native ligand* NAG.

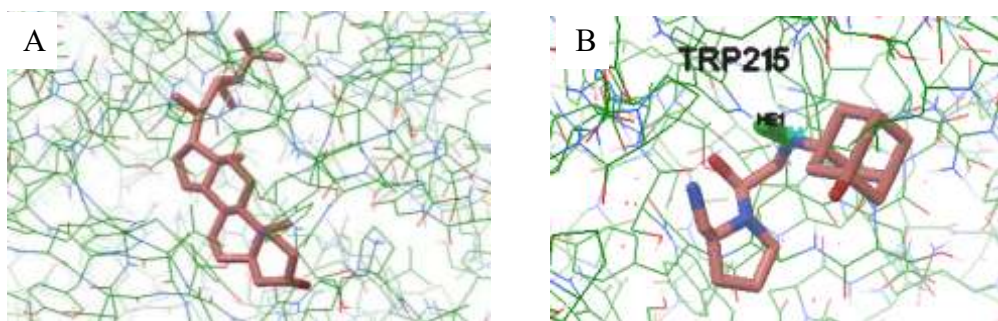
memperoleh hasil berupa struktur protein target tanpa *native ligand* dan struktur *native ligand*. Hasil dari preparasi protein target dapat dilihat pada Gambar 3.

3.3 Validasi Metode Molecular Docking

Validitas metode docking molekuler diketahui dengan cara men-docking-kan kembali (*redocking*) *native ligand* pada protein target menggunakan program *AutoDockTools* 1.5.6. Proses validasi metode docking molekuler yang pertama dilakukan adalah menambahkan atom hidrogen pada protein target yang sudah memiliki *pocket cavity*. Penambahan hidrogen bertujuan untuk menyesuaikan suasana docking agar mendekati suasana pH di dalam tubuh [9]. Selain itu, penambahan atom hidrogen memiliki tujuan untuk memunculkan kembali atom hidrogen pada makromolekul sehingga ikatan hidrogen yang terbentuk dapat teramati [10].

Dalam validasi metode molecular docking, dilakukan juga pengaturan *grid box* yang akan menjadi ruang untuk *native ligand* membentuk konformasi ketika di-

docking-kan dengan protein target dilakukan setelah protein. *Grid box* merupakan tempat dari ligand untuk berinteraksi dengan residu asam amino pada binding site protein target. Penentuan *grid box* dilakukan untuk mengetahui titik koordinat pada *binding site* dari suatu protein. Pengaturan *grid box* yang dilakukan adalah pengaturan koordinat *grid center* dan pengaturan *grid size* [11]. Parameter validasi dalam molecular docking berupa nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD menunjukkan perbandingan konformasi *native ligand* hasil docking dengan konformasi *native ligand* hasil pengukuran kristalografi [12]. Batas nilai RMSD yang dapat diterima adalah $\leq 3 \text{ \AA}$ [13]. Nilai RMSD yang diperoleh untuk protein NAG sebesar 0,00 \AA dan energi ikatan sebesar -3,76 kkal/mol. Berdasarkan hasil tersebut, metode yang digunakan dapat dikatakan valid sehingga proses docking β -Sitosterol dan vildagliptin dapat dilakukan. Visualisasi interaksi antara protein target dan *native ligand*-nya ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 5. (A) Visualisasi interaksi β -Sitosterol dengan protein *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4). (B) Visualisasi interaksi vildagliptin dengan protein *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4).

3.4 Docking β -Sitosterol dan Vildagliptin pada Protein Target *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4)

Senyawa β -Sitosterol dan vildagliptin yang telah dioptimasi kemudian di-docking-kan pada protein target menggunakan program *Autodock 4.2* dengan ukuran dan koordinat yang diperoleh saat validasi metode. Penggunaan ukuran *grid box* dan koordinat yang sama pada saat validasi dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa uji di-docking-kan tepat pada sisi aktif dari protein target sesuai dengan hasil validasi. Metode yang digunakan dalam docking β -Sitosterol dan vildagliptin sama dengan ketika validasi metode, yaitu *semirigid*, yang mana senyawa diatur dalam keadaan fleksibel dan protein target dalam keadaan *rigid*, sehingga memungkinkan senyawa untuk mencapai konformasi optimum untuk berikatan dengan sisi aktif pada protein target.

Proses docking menghasilkan nilai energi ikatan antara senyawa uji dengan protein target. Energi ikatan menunjukkan afinitas β -Sitosterol dan vildagliptin pada protein target. Semakin negatif energi ikatan yang diperoleh, ikatan yang terbentuk antara β -Sitosterol dan vildagliptin dengan protein target akan semakin stabil.

Nilai energi ikatan yang diperoleh pada β -Sitosterol dengan protein NAG sebesar -8,96 kkal/mol. Nilai energi ikatan yang diperoleh pada vildagliptin dengan protein NAG sebesar -7,48 kkal/mol. Hal

ini menunjukkan bahwa β -Sitosterol dengan protein target enzim DPP-4 NAG memiliki ikatan yang lebih stabil dibandingkan dengan vildagliptin dengan protein target enzim DPP-4 NAG. Sehingga berdasarkan hasil penelitian ini dapat diprediksi bahwa β -Sitosterol memiliki aktivitas sebagai antihiperqlikemia karena memiliki afinitas dengan protein *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4). Interaksi antara β -Sitosterol dengan protein *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4) dapat menghambat penghambatan enzim DPP-4, dikarenakan interaksi terjadi pada sisi aktif dari protein target yang mengakibatkan aktivitas inhibitor. Visualisasi interaksi antara β -Sitosterol dengan protein *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4) dan interaksi antara vildagliptin dengan protein *Dipeptidylpeptidase-4* (DPP-4) pada Gambar 5..

4. KESIMPULAN

β -Sitosterol dengan protein target enzim DPP-4 NAG memiliki ikatan yang lebih stabil (nilai energi ikatan sebesar -8,96 kkal/mol) dibandingkan dengan vildagliptin dengan protein target enzim DPP-4 NAG (nilai energi ikatan sebesar 7,48 kkal/mol). Sehingga, β -Sitosterol berpotensi sebagai antidiabetes secara *in silico*.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih kepada pihak-pihak yang mendukung penelitian, sumber

pendanaan maupun dalam penulisan artikel.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] IDF. One adult in ten will have diabetes by 2030. 5th edition Diabetes Atlas, 2019.
- [2] Guttula, S., Rao A.A., Sridhar G.R., Chakravarthy M.S. Protein ligand interaction analysis an in silico potential drug target identification in diabetes mellitus and nephropathy. *J. Bioinform. Seq. Anal.* 2011. 5(2), 95–99.
- [3] Singh, A. *Dipeptidyl peptidase-4*inhibitors: Novel mechanism of actions. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014.18(6), 753–759.
- [4] Filozof, C., Sherwyn S., James E.F. Effect of vildagliptin as add-on therapy to low-dose metformin. *World Journal Diabetes.* 2010. 1(1), 19-26.
- [5] Munhoz, A.C.M., Frode T.S. Isolated compounds from natural products with potential antidiabetic activity A systematic review. *Current Diabetes Reviews.* 2018. 14(1): 36-106.
- [6] Hypercube. *Hyper Chem Release 7: Tools for Molecular Modeling.* Ontario: Hypercube Incorporation. 2002.
- [7] Tahir, I., Wijaya K., Falah, I.I., Damayanti, R. *Pemodelan Molekul Senyawa MycosporineLike Amino Acids (MAAs-Like) sebagai Senyawa Penyerap Sinar UV.* dipresentasikan pada Seminar Nasional Hasil Penelitian MIPA di Semarang. 2004.
- [8] Kristiningrum, E. *Pencerah Alami Kulit, Continuing Medical Education.* Edisi Suplemen. 2017. 44: 15-22.
- [9] Drie, J.H.V. 2005. *Pharmacophore-Based Virtual Screening: A Practical Perspective*, Alvarez, J. and Schoicet, B., *Virtual Screening in Drug Discovery.* Taylor and Francis Group. Boca Raton. 157- 205.
- [10] Sastry, G.M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., Sherman, W. Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2013. 27(3):221–234.
- [11] Rachmania, R.A., Supandi, Cristina, F.A.D. Analisis Penambatan Molekul Senyawa Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Reseptor α Glukosidase sebagai Antidiabetes. *Pharmacy.* 2016. 13(2): 239-251.
- [12] Saputri, K.E., Fakhmi, N., Kusumaningtyas, E., Priyatama, D. Santoso, B. Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase Dengan Autodock-Vina. *Chimica et Natura Acta.* 2016. 4(1):16-20.
- [13] Jain, A.N., Nicholls, A. Recommendations for Evaluations of Computational Methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2008. 22:133-139.