

VIRTUAL SCREENING METABOLIT AKTIF SENYAWA ASAM DARI PACAR AIR(*Impatiens balsamina L.*) TERHADAP RESEPTOR SULFONILUREA

RENDRA RUKMONO^{1*}, INARAH FAJRIATY¹, HAFRIZAL RIZA¹, MITRA HANDINI¹

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Tanjungpura University, Pontianak, Indonesia

*Email: rendra.rukmono@yahoo.com

PENDAHULUAN

Diabetes adalah penyakit yang disebabkan oleh pankreas yang tidak menghasilkan insulin dalam jumlah yang cukup untuk menurunkan gula darah (1). Regulasi sekresi insulin di sel β pankreas diperani oleh kanal K_{ATP} yang terdiri dari subunit SUR1 dan Kir6.2 (2). Di dalam sel β pankreas, kadar ATP yang tinggi menyesuaikan dari peningkatan kadar glukosa plasma yang menyebabkan penutupan kanal K_{ATP} . Penutupan ini menyebabkan depolarisasi membran, pemasukan Ca^{2+} , dan selanjutnya terjadi pelepasan insulin. SUR1 sangat jelas berpotensi pada efek ini (3).

Secara empiris pacar air telah digunakan masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit (4). Ekstrak herba pacar air memiliki LD_{50} lebih besar dari 5000 mg/kgBB, di mana masuk ke dalam kategori relative tidak toksik (5). Secara in vitro ekstrak biji pacar air menunjukkan efek antidiabetes (6). Secara in vivo tanaman ini memiliki aktivitas antidiabetes yaitu pada uji resistensi insulin dan toleransi glukosa yang dilakukan peneliti sebelumnya dengan dosis 250mg/kgBB. Senyawa asam adalah salah satu golongan senyawa yang ada pada pacar air. Terdapat beberapa senyawa asam yang telah diisolasi dari akar pacar air, yaitu: Asam Echinosistik, Asam Ftalat, Asam P-Hidrobenzoat, dan Ftalat Anhidrat (7).

Berdasarkan uraian di atas, perlu diketahui mekanisme yang terjadi antara senyawa-senyawa asam yang ada pada Pacar Air terhadap reseptor sulfonilurea dengan menggunakan uji *in silico* untuk melihat afinitas dan posisi senyawa pada reseptor.

Kata kunci: Pacar Air, Diabetes, Sulfonilurea

ALAT DAN BAHAN

Alat

Alat yang digunakan adalah laptop yang sudah terinstal aplikasi: Autodock Tools, Discovery Studio 3.5 Visualizer, MarvinSketch, Open Babel, Pyrx.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah senyawa asam dari pacar air: Glibenklamid, Asam Echinosistik, Asam Ftalat, Asam P-Hidrobenzoat, Ftalat Andhidrida.

METODE

Persiapan Struktur Ligand

Ligan-ligan yang digunakan dibuat menggunakan program MarvinSketch dan disimpan dalam bentuk konformasi tiga dimensi. Format ligan-ligan ini kemudian diubah menjadi format .pdb menggunakan program Open Babel. Kemudian dilakukan optimasi berupa pengaturan number of active torsio menggunakan program AutoDockTools. Diubah lagi format menjadi mol2. Selanjutnya dilakukan minimisasi energi menggunakan program Ascalaph Designer.

Persiapan Reseptor Untuk Docking

SUR1 memiliki kode akses di PDB yaitu id.2FF7 dan memiliki 1581 asam amino dan strukturnya berbentuk seperti kristal di mana sisi aktifnya berikatan dengan ATP (8)(9). Data molekul diunduh dalam format .pdb. Makromolekul kemudian dipisahkan dari pelarut dan ligan atau residu non standar menggunakan program Discovery Studio 3.5 Visualizer. Makromolekul yang dipisahkan tersebut akan digunakan untuk penambatan dan disimpan dengan format .pdb. setelah itu, makromolekul akan dioptimasi menggunakan AutoDock Tools. Optimasi tersebut meliputi penambahan atom hidrogen dan pengaturan grid box parameter. Hasil ini disimpan dalam format .pdbqt.

Validasi Metode

Validasi metode penambatan dilakukan dengan software Pyrx. Validasi ini dilakukan terhadap ligan dan hasil *docking*. Parameter yang digunakan yaitu *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Metode docking dikatakan valid jika memiliki nilai $RMSD < 2$ (10).

Penambatan molekul

Penambatan molekul ligan dan protein serta kontrol positif dan protein dilakukan menggunakan program Pyrx berbasis AutoDock Vina. Hasil penambatan yang diperoleh yaitu berupa *binding affinity* (kcal/mol) dan nilai RMSD. Hasil kemudian akan tersimpan dengan format .csv untuk nilai hasil docking dan .pdbqt untuk ligan dan protein yang telah didocking.

Analisis Data

Hasil penentuan nilai sifat kimia-fisika (logP, BM, H akseptor dan H donor) senyawa-senyawa Pacar air kemudian dianalisis dengan hukum Lima dari Lipinski, untuk memprediksi sifat absorpsi dan permeabilitas senyawa. Kemudian dilihat asam-asam amino apa saja yang terlibat pada proses interaksi obat reseptor, demikian pula dengan nilai energi ikat (kkal/mol). Semakin rendah energi menunjukkan interaksi obat-reseptor semakin stabil dan diprediksi mempunyai aktivitas biologi semakin tinggi (11)(12)(13).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Fisika-Kimia

Analisis sifat fisika-kimia didasarkan pada hukum Lipinski yang disebut juga *rule of five* (aturan lima), yang berarti tiap nilai dari aturan tersebut berjumlah kelipatan lima (14). Hasil analisis sifat fisika-kimia

berdasarkan struktur untuk melihat jumlah H donor (NH dan OH) dan H aseptor (N dan O), berat molekul, serta log P. Menurut aturan Lipinski syarat dari H donor tidak lebih dari 5 dan H aseptor tidak lebih dari 10 agar memiliki permeabilitas yang baik.

Tabel 1. Hasil Penentuan Sifat Fisika-Kimia Senyawa Ligan

Nama Molekul	Rumus Molekul	Log P	Berat Molekul (g/mol)	H Donor	H Aseptor
Glibenklamid	$C_{23} H_{28} Cl N_3 O_5 S$	3.43	494.017	3	5
Asam Echinosistik	$C_{30} H_{48} O_4$	5.80	472.714	3	1
Asam Ftalat	$C_8 H_6 O_4$	1.08	166.136	2	2
Asam P-Hidrobenzoat	$C_7 H_6 O_3$	1.28	138.125	2	1
Ftalat Anhidrida	$C_8 H_4 O_3$	1.03	148.12	0	3

Berdasarkan analisis struktur yang telah dilakukan diketahui bahwa semua senyawa memenuhi syarat. H donor dan H aseptor menjelaskan bahwa semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi. Berat molekul senyawa yang dapat menembus membrane biologis menurut aturan Lipinski adalah tidak lebih dari 500 g/mol, didapat bahwa semua senyawa telah memenuhi syarat. Berat molekul yang lebih dari 500 g/mol tidak bisa berdifusi menembus membrane sel. Nilai log P yang memenuhi syarat aturan Lipinski adalah tidak lebih dari 5. Nilai log P yang negatif juga tidak baik karena molekul tersebut tidak dapat melewati membrane lipid bilayer (15). Didapat bahwa ada 1 senyawa yang memiliki log P lebih dari 5 yaitu: Asam Echinosistik. Hal ini diakibatkan banyaknya atom C yang menyebabkan meningkatnya koefisien partisi, sehingga bioavalabilitasnya rendah. Sehingga jumlah senyawa yang tidak memenuhi syarat ini yaitu 1 senyawa. Nilai log P menggambarkan kemampuan senyawa untuk dapat larut dalam cairan membrane biologis (kelarutan oktanol/air) (16). Semakin besar nilai log P, maka semakin hidrofobik molekul tersebut. Molekul yang memiliki sifat terlalu hidrofobik cenderung memiliki tingkat toksisitas yang besar karena akan tertahan lebih lama pada lipid bilayer dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektifitas ikatan menjadi berkurang terhadap enzim targe. Umumnya, aturan Lipinski menggambarkan solubilitas senyawa tertentu untuk menembus membran sel oleh difusi pasif (15). Senyawa-senyawa yang memenuhi semua syarat Lipinski adalah: Glibenklamid (kontrol positif), Asam Ftalat, Asam P-Hidrobenzoat, dan Ftalat Anhidrida.

Tabel 3. Hasil Analisis *Docking* Senyawa Impatiens balsamina dan Kontrol Positif

Nama Molekul	Afinitas Ikatan (kkal/mol)	Jenis Ikatan	dan jarak Residu Asam Amino yang terlibat dan jaraknya
Glibenklamid	-9.3	Van der waals	Arg517 , <i>Leu541</i> , Gln516 , <i>Val545</i> , <i>Gly546</i> , <i>Arg618</i> , <i>Asn622</i>
		Ikatan hidrogen	<i>Val547</i> (2.29 Å, 2.29 Å)
		Ikatan karbon hidrogen	<i>Ala619</i> (3.34 Å)
		Pi <i>T-shape</i>	Phe518 (5.24 Å)
		Alkil	Pro538 (4.47 Å), <i>Ala566</i> (4.09 Å),
		Pi-Alkil	<i>Leu541</i> (5.33 Å), <i>Arg542</i> (3.84 Å), <i>Ala566</i> (4.66 Å),
Asam Echinosistik	-7.8	Van der walls	Gly654 , Gly495 , His649
		Ikatan hidrogen	Asn669 (2.247 Å)
		Alkil	Val497 (4.86 Å), Cys652 (4.57 Å), Ala670 (4.16 Å), Lys653 (3.74 Å), Val497 (4.17 Å), Met648 (4.17 Å), Val497 (4.38 Å)
Asam Ftalat	-6.3	Van der walls	Gln516 , Pro538
		Ikatan hidrogen	<i>Arg542</i> (2.14 Å)
		<i>Pi-Sigma</i>	<i>Arg542</i> (3.58 Å)
		<i>Pi-Pi T-shape</i>	Phe518 (5.34 Å)
		Pi-Alkil	<i>Leu541</i> (5.31 Å), <i>Val545</i> (5.18 Å)
Asam P-Hidrobenzoat	-5.7	Van der walls	Met648 , Phe629 , Ile659 , Glu631 , Ile660 , Asp630 .
		Ikatan Hidrogen	HIS662 (1.99 Å), Arg663 (2.79 Å), THR666 (2.24 Å)
		<i>Pi-Sigma</i>	Thr666 (3.97 Å)
		Pi-Alkil	Ala632 (4.71 Å)
Ftalat Anhidrida	-6.1	Van der waals	<i>Ile616</i> , <i>Gln612</i> , <i>Val548</i> , <i>Gln550</i> , Glu631 , Ala632 , Thr666 , Met648
		<i>Unfavorable Donor-Donor</i>	Asp630 (2.82 Å)
		Pi-Pi <i>T-Shaped</i>	Phe629 (4.89 Å)
		Pi-Alkil	Ile644 (5.08 Å)

Didapat nilai negatif afinitas dari semua senyawa. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan yang kuat terhadap reseptor (17). Teori entalpi energi menyatakan semakin rendah energi ikat/afinitas (bersifat eksoterm) suatu senyawa dengan reseptor, maka senyawa tersebut semakin mudah membentuk ikatan dengan reseptor (13) (18).

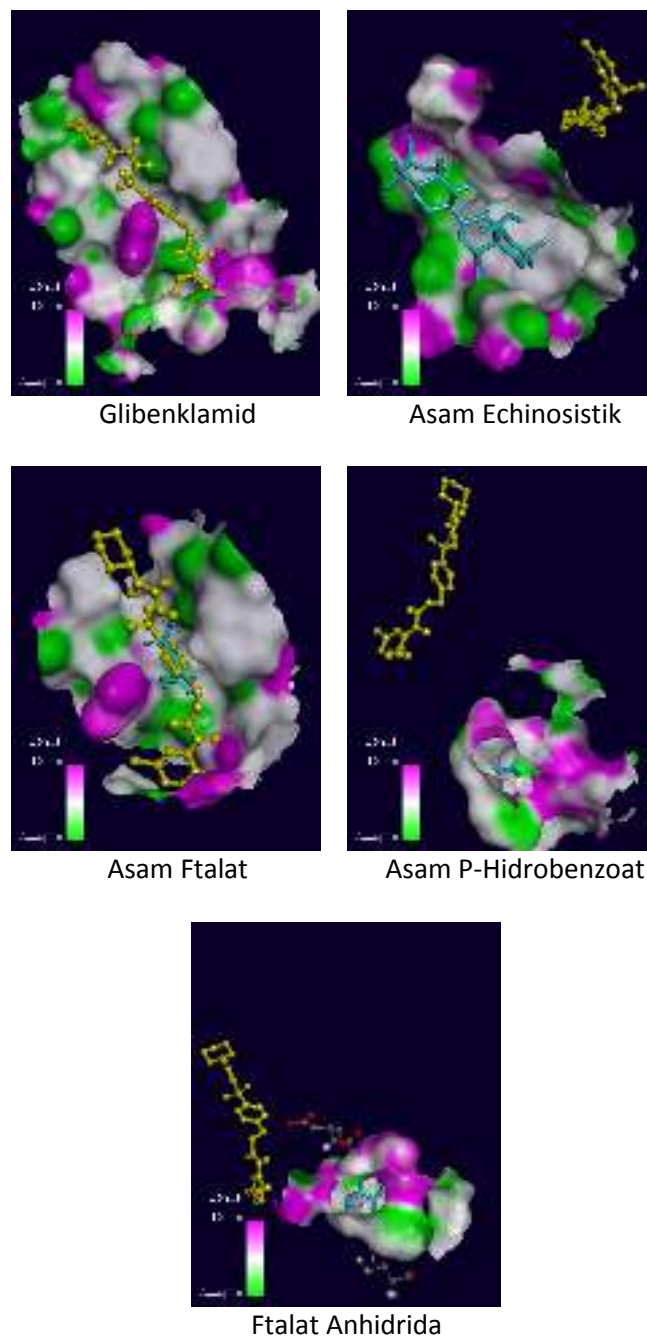
Nilai afinitas terbesar dari senyawa di atas adalah Asam Echinosistik yaitu -7.8 kkal/mol, dimana lebih kecil daripada kontrol positif Glibenklamid yaitu -9.3 kkal/mol.

Nama Molekul	Residu Memasuki Rentang	Residu Sama dengan Kontrol Positif
Glibenklamid	4	-
Asam Echinosistik	11	0
Asam Ftalat	3	7
Asam P-Hidrobenzoat	11	0
Ftalat Anhidrida	7	0

Residu asam-asam amino yang didapat dari docking semuanya memasuki rentang sisi aktif berdasarkan literatur. Ligan yang paling banyak jumlah residu yang memasuki rentang sisi aktif adalah Asam Echinosistik dan Asam P-Hidrobenzoat, sehingga dapat dikatakan kedua ligan ini memiliki interaksi yang baik dengan reseptor, hal ini didukung pula dengan nilai afinitasnya yang cukup baik yaitu secara berurutan -7.8 dan -5.7. Ligan yang paling banyak jumlah residu yang sama dengan kontrol positif adalah Asam Ftalat, dimana memiliki kesamaan yaitu sebanyak 7 asam amino, sehingga berkemungkinan bahwa senyawa ini lebih memiliki efek yang sama dengan kontrol positif daripada senyawa lain yang tidak memiliki residu yang sama dengan kontrol positif.

Nama Molekul	RMSD
Glibenklamid	0.0
Asam Echinosistik	0.0
Asam Ftalat	0.0
Asam P-Hidrobenzoat	0.0
Ftalat Anhidrida	0.0

Nilai RMSD yang diperoleh dari penambatan masing-masing ligan < 2 , menunjukkan bahwa prediksi ikatan tersebut berhasil dimana perbedaan tiap pengulangan tidak berbeda signifikan. Hasil *docking* dari senyawa-senyawa di atas menggunakan mode yang memiliki afinitas paling negatif (*mode 1*), yang secara otomatis memiliki nilai RMSD 0.000.



Gambar 16. Hasil Visualisasi Senyawa Pacar Air dan Kontrol Positif Terhadap Reseptor SUR1

(Gambar 1) Senyawa pacar air menempati sisi aktif SUR-1 yang juga ditempati oleh kontrol positif glibenklamid, yaitu Asam Ftalat sisi aktif reseptor dan ligan bersifat *lock and key*, yaitu sudah diperhitungkan berdasarkan sifat sterik, struktur geometri, jenis ikatan, afinitas dan sifat elektronik yang berkaitan langsung dengan atom-atom atau gugus-gugus pada residu asam amino (19).

Afinitas dari tiap ligan dilakukan analisis menggunakan program SPSS. Jumlah data yang digunakan yaitu 35 data. Uji yang dilakukan pertama adalah uji normalitas, uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Hasil uji normalitas dari tiap kelompok ligan terdistribusi normal ($P > 0.05$).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas, uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah populasi memiliki variansi yang sama atau tidak. Hasil uji homogenitas dari tiap kelompok ligan menunjukkan populasi data bervariasi sama berdasarkan nilai yang didapat yaitu $P=0.384$. Data sudah dapat dikatakan independent karena data telah terdistribusi normal dan memiliki variansi yang sama. Data ini telah memenuhi syarat untuk dilakukan uji ANOVA, uji ini dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan rata-rata antara sampel yang diuji. Hasil uji menunjukkan nilai $P=0.00$ dimana lebih kecil dari nilai $\alpha = 0.05$. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata, untuk itu maka dilanjutkan ke uji Post Hoc untuk melihat besarnya perbedaan rata-rata. Uji Post Hoc yang digunakan yaitu LSD.

Hasil yang didapat dari uji Post hoc yaitu glibenklamid berbeda signifikan terhadap semua kelompok. Semua senyawa memiliki nilai negatif daripada glibenklamid, hal ini berarti nilai afinitas dari semua senyawa tersebut lebih kecil daripada glibenklamid dan dikarenakan tidak terdapatnya perbedaan signifikan antara glibenklamid dan senyawa-senyawa yang ada, maka dapat dikatakan bahwa tidak ada senyawa yang lebih tinggi nilai afinitasnya daripada glibenklamid. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dari hasil docking senyawa-senyawa ini kemungkinan tidak memiliki efek yang lebih baik daripada glibenklamid dalam mengatasi diabetes.

KESIMPULAN

Senyawa yang paling baik afinitasnya adalah Asam Echinostik dimana afinitasnya sebesar -7.8 namun tidak berada di posisi yang sama dengan kontrol positif. Adapun senyawa yang berada di posisi yang sama dengan glibenklamid adalah Asam Ftalat, namun afinitas yang dimiliki tidak lebih besar daripada glibenklamid yaitu -6.3. Hasil dari uji *in silico* ini menunjukkan kemungkinan ada efek antidiabetes seperti mekanisme glibenklamid dari senyawa asam herba Pacar Air walaupun tidak begitu signifikan.

REFERENCES

1. Bartosikova L, Necas J, Suchy V, et.al. Monitoring of antioxidative effect of morine in alloxan-induced diabetes mellitus in the laboratory rat. *Acta Vet. BRNO*. 2003; 72: p. 191-200.
2. Aguilar-Bryan L, Nichols C, Wechsler S, Clement J, Boyd A, GG, et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator. *Science*. 1995; 268: p. 423-6.
3. Proks P, Lippiat J. Membrane ion channels and diabetes. *Curr Pharm Des*. 2006; 12: p. 485-501.
4. Delimartha S. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid ed. Jakarta: Trubus Agriwidya; 2003.
5. Nurqolbiah E, Indri K, Siti N. Uji Toksisitas Fraksi Air Impatiens balsamina Pada Tikus Betina Galur Sprague Dawley. *Pharm Sci Res*. 2014 April; 1(1): p. 16-29.

6. Bole S, Shivakumara. , Seitajit S, Naveen K, Swarnava K, D. S, et al. Phytochemical Screening and Biological Activities of *Impatiens balsamina* L. Seeds. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013 Agustus; 2(6): p. 5363-76.
7. Sakunphueak A, Tansakul P, Umehara K, Panichayupakaranant P. Effect of methionine on production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures and detection of some secondary metabolites. *Pharmaceutical Biology*. 2012 September; 52(1): p. 36-41.
8. Sahu R, Shukla N. In-silico analysis of different plant protein and their essential compound with sulfonyleurea binding protein of β -cells of *Homo sapiens* for curing diabetes mellitus type II disease. *Eur Chem Bull*. 2014; 3(6): p. 568-576.
9. Zaitseva J, Oswald C, Jumpertz T, Janewein S, Wiedenann A, Holland I, et al. A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer. *The EMBO Journal*. 2006; 25(14): p. 173-9.
10. Yanuar A, Suhartanto H, Mun'im A, Anugraha B, Syahdi R. Virtual Screening of Indonesian Herbal Database as HIV 1 Protease Inhibitor. *Bioinformation*. 2014; 10(2): p. 52-5.
11. EM. K, Steindl T, Langer T. Recent advances in docking and scoring. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2005; 1(1): p. 93-102.
12. Kapetanovic I. Computer-Aided drug discovery and development: in silico-chemico-biological approach. *Chem Biol Interact*. 2008; 171(2): p. 165-76.
13. Chan S, Labute P. Training a scoring function for the alignment of small molecules. *J. Chem. Inf. Model*. 2010; 50: p. 1724-35.
14. Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chem Rev*. 1971; 71(6): p. 525-616.
15. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001 Maret; 46(1-3): p. 3-26.
16. Block J. Drug Design Strategies. In Beale J, Block J, Wilson G. Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 38-9.
17. Elengoe A, Mohammed A, Salehuddin H. Modeling and Docking Studies on Novel Mutants (K71L and T204V) of the ATPase Domain of Human Heat Shock 70 kDa Protein 1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014 April; 15: p. 6797-814.
18. Trott O, Olson J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comp Chem*. 2010; 31: p. 455-61.
19. Morris G, Goodsell D, Pique M, Lindstrom W, Huey R, Forli S, et al. User Guide: AutoDock Version 4.2. [Online]. User guide; 2014 [cited 2018 Maret 24. Available from: http://autodock.scripps.edu/downloads/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/AutoDock4.2.6_UserGuide.pdf.
20. Pathak S, Dorfmueller H, Borodkin V, Aalten M. Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Pubmed Central J*. 2008 Agustus; 15(8): p. 799-807.
21. Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Naruse A. New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biol Pharm Bull*. 1999 September; 22(9): p. 988-9.

22. Srinivasan K, Ramarao P. Animals Models in Type 2 Diabetes Research: An Overview. Indian J. Med. Res. 2007 Maret; 125.
23. Deeds M, Anderson J, Armstrong A, Gastineau D, Hiddinga H, Jahangir A, et al. Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. NIH Public Acces. 2011 Juli; 45(3): p. 131-40.
24. Lanywati E. Diabetes Melitus Penyakit Kencing Manis. Yogyakarta: Kanisius; 2001.
25. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2008 January; 31(1): p. 562-567.