

Pembuatan Komplek Enzim Dan Validasi Molecular Docking Secara Internal Pada Carbonic Anhydrase Ii Sebagai Diuretik Lemah

Manufacturing Enzyme Complexes And Internal Molecular Docking Validation Of Carbonic Anhydrase Ii As A Weak Diuretic

Okta Nursanti^{1*}, Liliek Nurhidayati², Esti Mumpuni²

¹ Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan, Jl. Anyar, Sukahati, Kec. Citeureup, Kabupaten Bogor, Jawa Barat, Indonesia, Indonesia. *e-mail: okta.nursanti@yahoo.com

² Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah, Jakarta Selatan, Daerah Khusus Ibukota Jakarta, Indonesia

Abstrak. Skrining virtual, atau skrining *insilico* adalah metode komputasi berkinerja tinggi untuk menganalisis sekumpulan database senyawa kimia untuk mengidentifikasi kandidat senyawa obat. Studi penelitian mendemonstrasikan potensi senyawa yang ada didalam rumput coklat menggunakan penelitian molecular docking. Skrining docking molekuler komputasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD). Enzim carbonic anhydrase diambil dari Protein Data Bank (5GMN). *Molecular docking* dilakukan dengan menggunakan *Molegro Virtual Docker (MVD)* 6.0 pada sisi aktif enzim *carbonic anhydrase* untuk memprediksi aktivitas senyawa. Validasi *docking* dilakukan dengan melakukan *redocking* ligan alami dari enzim 5GMN ke dalam tapak aktifnya. Kriteria penerimaan ditetapkan dengan nilai *Root Mean Square Deviation (RMSD)* di bawah 2.0 Å. Validasi metode dapat dilihat dari nilai RMSD yang diperoleh saat menambatkan referensi ligan di reseptor. Nilai RMSD 1.13 Angstrom (RMSD <2). MolDock (Grid) Score (scoring function) dan MolDock Optimizer (algoritma) menunjukkan metode ini memiliki nilai validitas yang tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua senyawa bekerja relatif baik terhadap Polmacoxib sebagai ligan alami dan juga skor rerank yang lebih rendah dibandingkan Polmacoxib dan Celecoxib. Penelitian ini dapat disimpulkan Trepthloroethol, Fukosterol, Eckol, Asam Sargahidrokuinat, 7-Phloroecol, Dieckol, Asam Klorogenat, Diphlorethohydroxycarmalol

Kata Kunci: Carbonic anhydrase, molecular docking, stigmasterol

Abstract. Virtual screening, or *insilico* screening is a high-performance computational method for analyzing a set of chemical compound databases to identify candidate drug compounds. Research studies demonstrate the potential of compounds present in brown grass using molecular docking research. Computational molecular docking screening was performed using Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) software. The carbonic anhydrase enzyme was extracted from the protein database (5GMN). Molecular docking was performed using Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0 at the active site at the active site of the carbonic anhydrase enzyme to predict the activity of the compound. Docking validation was carried out by redocking the natural ligand of the 5GMN enzyme into its active site. Acceptance criteria were determined with a Root Mean Square Deviation (RMSD) value below 2.0 . Validation of the method can be seen from the RMSD value obtained when anchoring the reference ligand to the receptor. RMSD value 1.13 Angstrom (RMSD < 2). MolDock (Grid) Score (scoring function) and MolDock Optimizer (algorithm) show that this method has a high validity value. The results showed that all compounds worked relatively well against Polmacoxib as a natural ligand and also had a lower rerank score than Polmacoxib and Celecoxib. From this study, it can be concluded that Trepthloroethol, Fukosterol, Eckol, Sargahydroquinic Acid, 7-Phloroecol, Dieckol, Chlorogenic Acid, Diphlorethohydroxycarmalol

Keywords: carbonic anhydrase, molecular docking, stigmasterol

PENDAHULUAN

Penemuan dan pengembangan obat merupakan suatu proses yang memerlukan investasi besar dan memiliki tantangan tersendiri disetiap tahapannya, penilaian keamanan dan efikasi obat berdasarkan eksperimen laboratorium (*wet lab*) pada hewan coba, memiliki banyak masalah serius diantaranya masalah efikasi untuk penggunaan jangka panjang. Seperti diketahui mengamati efek kronik pada hewan tidak memungkinkan karena terbatasnya umur hewan tersebut (biasanya paling lama 4-5 tahun), disisi lain umur manusia normal adalah 60-70 tahun. Karena itu, hasil eksperimen yang diperoleh dari penggunaan hewan coba sulit diekstrapolasi pada manusia. Pendekatan lain untuk menilai efek farmakologi pada hewan adalah dengan memberikan obat dengan dosis yang lebih tinggi daripada dosis pada manusia, namun hal ini juga menimbulkan masalah lain yaitu overdosis sehingga akurasi dan realibilitas percobaan menggunakan hewan coba belum dapat dijawab.

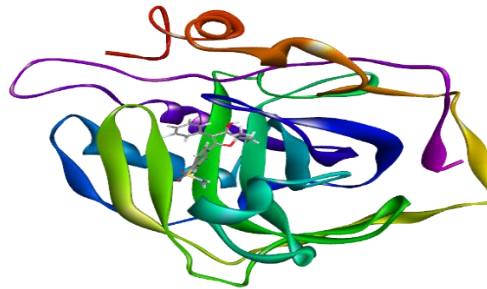
Hal lain berkenaan dengan eksperimen hewan coba adalah persoalan biaya yang relatif besar, disamping masalah moral dan etika hewan diberikan perlakuan tertentu yang banyak mendapat kritikan dari berbagai komunitas pelindung hewan. Selain itu, menurut data Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat/ *US Food and Drug Administration (FDA)*, lebih dari 90 persen senyawa kimia baru gagal pada uji klinik (uji pada manusia), baik karena masalah efikasi maupun karena masalah keamanan. Seringkali ditemukan, senyawa kimia baru yang diuji menunjukkan hasil sangat baik pada eksperimen menggunakan hewan coba, namun ketika diuji pada manusia, efek yang dihasilkan menjadi berbeda, dari perspektif industri farmasi, tentunya hal tersebut mesti dihindari sedini mungkin.

Disisi lain, jumlah zat aktif baru yang ditemukan terus meningkat secara drastis dan untuk melanjutkan uji senyawa-senyawa baru tersebut tentunya penggunaan metode konvensional seperti penggunaan hewan coba tidak lagi memadai. Karena itu beragam pendekatan alternatif terus dikembangkan untuk mengurangi, membatasi, atau bahkan menggantikan uji-uji yang menggunakan hewan untuk mengetahui kemanan dan efikasi obat. Salah satunya melalui apa yang disebut sebagai *Computer Aided Drug Design (CADD)* atau desain obat berbantuan komputer. Inti CADD adalah menggunakan teknologi komputer untuk melakukan prediksi aktivitas dan sifat-sifat molekul lainnya pada kandidat obat diuji laboratorium.

METODE

Alat-alat yang digunakan adalah perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini. Personal computer intel core i5-TM6400, 2.7 ghz, 4 core dan 4 thread, Ram 32 GB (2666Mhz), Graphic card NVIDIA Geforce GTX 1650 4GB, Solid State Drive (SSD) XPG SX6000 PCIe Gen3x2 M.2 2280 128 GB. Hard Disk Drive 3000 GB. Solid State Drive (SSD) colorfull PCIe Gen3x2 M.2 2280 120 GB. Personal computer dengan spesifikasi Processor AMD Ryzen 7@ 360 Ghz, 8 core dan 16 Thread RAM 32 GB (3200 Mhz), Graphic card NVIDIA Geforce RTX 2070 super 8 GB, Hard Disk Drive 1000 GB, Solid State Drive (SSD) XPG SX 8200 PRO S12 GB M.2 NVMe. Aplikasi yang digunakan pada penelitian ini antara lain dan beberapa aplikasi baik *online* maupun *offline*. MOE 2014.0901 (Chemical Computing Group, 2014) dengan lisensi dari *Chemical Computing Incorporation Canada. Molegro Virtual Docker* digunakan untuk proses *docking* dan preparasi protein yang digunakan. Dapat diunduh secara berbayar tetapi bisa menapatkan *free trial* selama satu bulan di di <http://molexus.io/molegro-virtual-docker/>.

Bahan yang digunakan adalah struktur kristal tiga dimensi (3D) dari *Carbonic anhydrase* yang terikat dengan Polmacoxib dengan kode PDB (Protein Data Bank) = 5GMN, homo sapiens yang diperoleh dari *online database: website NCBI, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (www.ncbi.nlm.nih.gov)* dan *website Protein Data Bank (www.pdb.org)*. Tujuan menyiapkan struktur reseptor 3D adalah untuk memperbaiki struktur dan untuk mempersiapkan data reseptor analisis komputasional lebih lanjut. Saat ini, sumber utama data struktur biomolekuler 3D adalah kristalografi sinar-X. Reseptor *Carbonic anhydrase II* tidak perlu dilakukan homologimodeling karena sudah ada crystal structure-nya, hanya perlu memilih reseptor mana yang akan digunakan karena di *Protein Data Bank* untuk reseptor sudah tersedia. Beberapa faktor kunci yang dapat memandu pemilihan reseptor Adalah resolusi kurang dari 2 Å atau lebih halus (lebih kecil). *R free* semakin kecil nilainya, semakin baik. Nilai *R* 0,5 atau lebih besar menunjukkan model yang buruk. Protein normal *wildtype*/tidak mengalami mutase. Protein diisolasi dari homosapien. Pemilihan reseptor target yang akan digunakan berdasarkan beberapa kriteria yaitu: nilai resolusi < 2.75, belum dilakukan mutasi terhadap asam amino tertentu, sudah merupakan protein yang diisolasi dari manusia (human), Berdasarkan pertimbangan tersebut maka untuk penelitian ini menggunakan kode 5GMN, homo sapiens dengan resolusi 1,9 Angstrom.



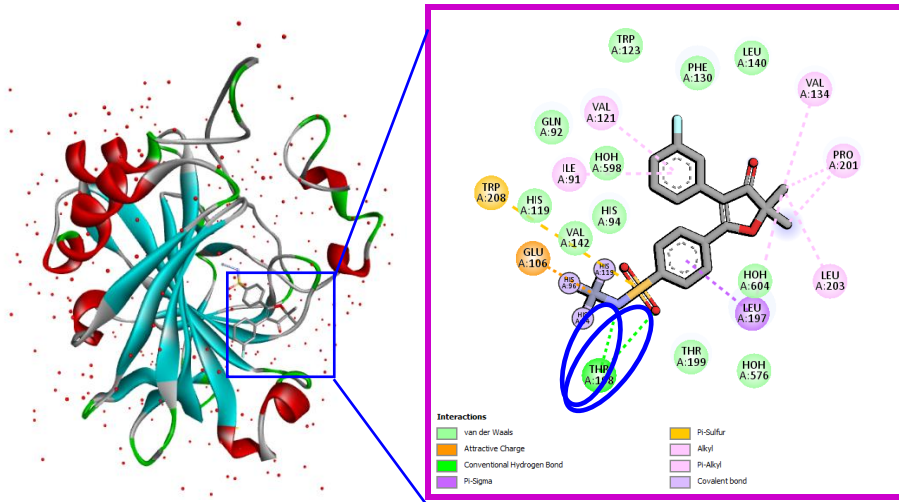
Gambar 1. Komplek 5GMN yang diunduh dari Protein Data Bank

Senyawa yang terdapat pada Rumput laut cokelat (*Sargassum sp.*). Ligand alami (*native ligand*) dan pembanding (*training set*). Ligand alami (*native ligand*) adalah Polmacoxib, dan merangkap sebagai *training set* dengan celecoxib sebagai *training set*. Struktur tiga dimensi protein yang akan digunakan didapat dari *Protein Data Bank*. Struktur di *download* dalam format (.pdb). Proses pembuatan makromolekul enzim ini dimulai dengan menghilangkan ligan alami dan molekul air. Selanjutnya, atom hidrogen polar ditambahkan dan muatan parsial Kollman dihitung. (Fakih et al., 2020). Pada protein terpilih dilakukan pengecekan *cavity* atau sisi aktif pada model struktur protein dengan menggunakan aplikasi *Molegro Virtual Docker*. Hasil penelitian yang telah dilakukan, *cavity* yang didapat sangat kecil dan terletak di luar daerah struktur molekul. *Cavity* yang terlalu kecil tidak sesuai dengan ukuran senyawa pembanding sehingga akan sulit terjadinya ikatan antara protein dan ligan. Posisi *cavity* yang berada diluar struktur tidak dapat dilakukan proses *docking* karena tidak akan ada interaksi yang terjadi. Maka dari itu diusulkan pembuatan kompleks baru dengan bantuan MOE.

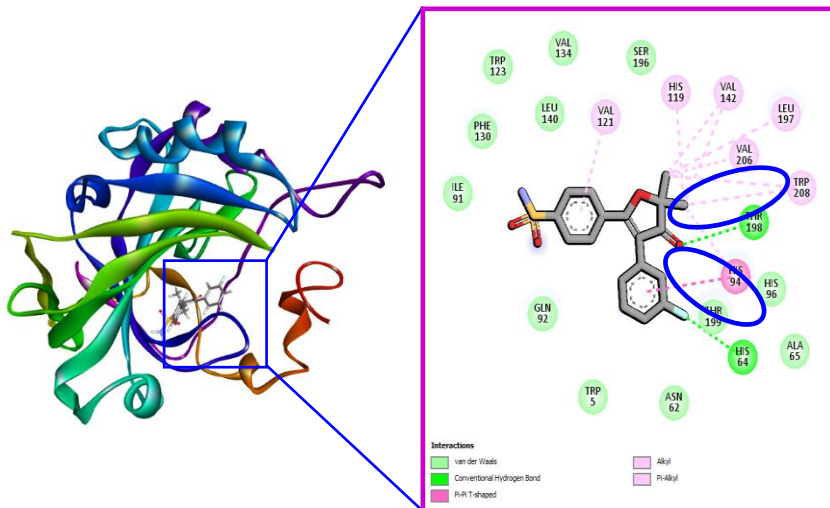
Penambatan molekul merupakan proses *rigid receptor docking* yang berarti bahwa makromolekul diposisikan dalam kondisi kaku. Ligan yang akan di-*docking* sendiri diatur dalam kondisi fleksibel. Sebelum digunakan, metode penambatan divalidasi terlebih dahulu terhadap dua aspek. Prosedur yang digunakan adalah *re-docking* ligan alami

terhadap makromolekul bawaan. Parameter validasi yang digunakan adalah nilai RMSD yang dihitung antara *docking pose*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

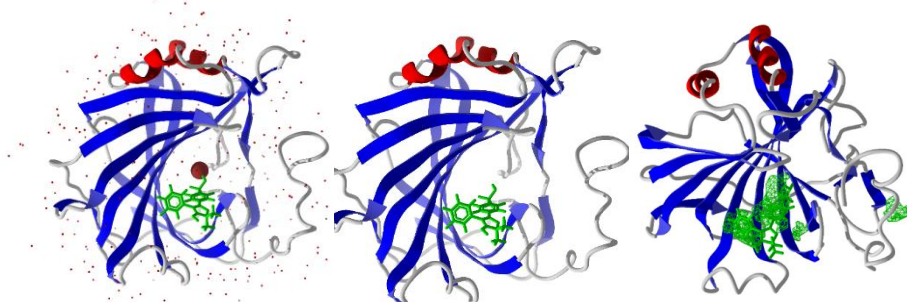


Gambar 2. Visualisasi Komplek 5GMN yang diunduh dari Protein Data Bank

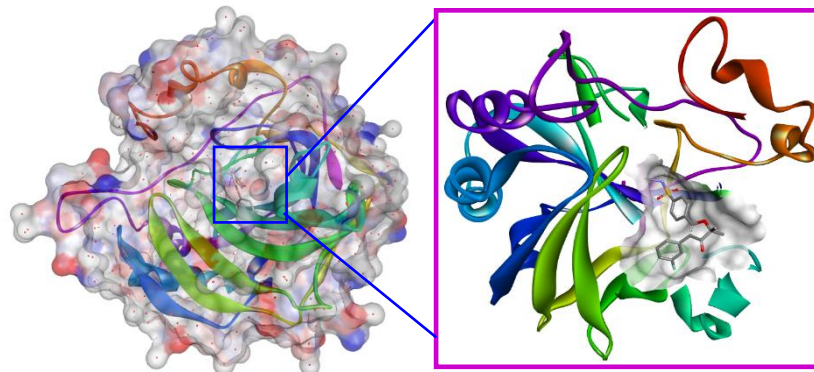


Gambar 3. Visualisasi Komplek 5GMN yang telah dihilangkan molekul air

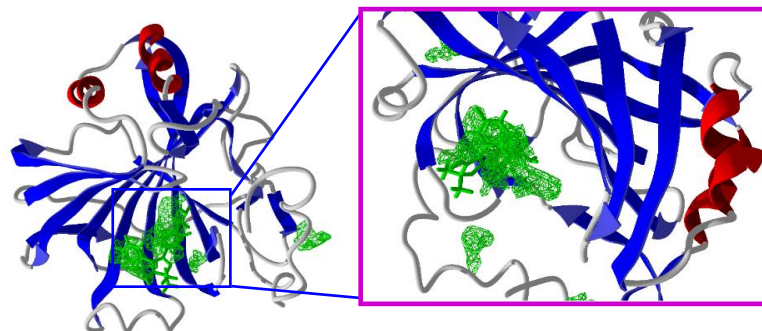
Perbaikan Enzim



Gambar 4. Visualisasi Komplek 5GMN yang telah dihilangkan molekul air nya

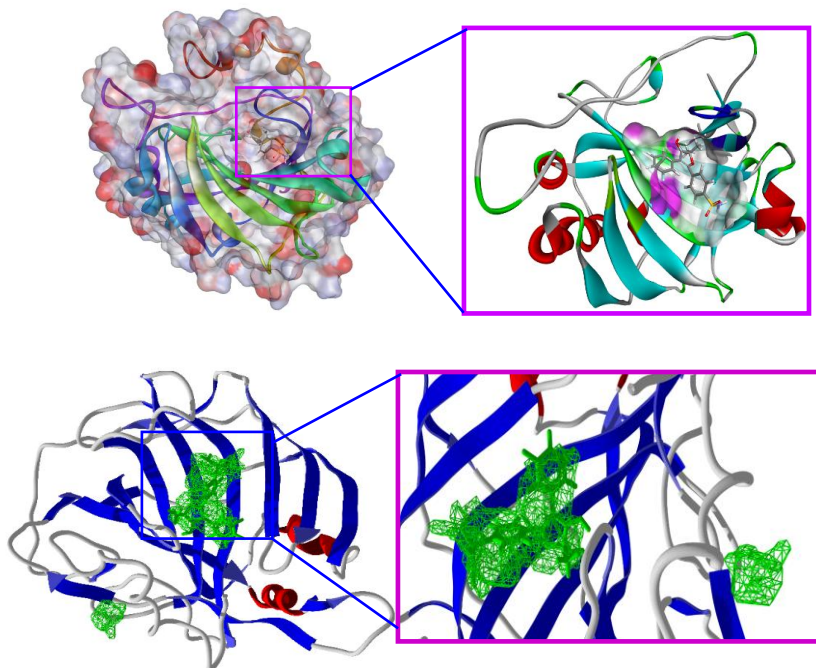


Gambar 5. Data PDB terdapat air dan cofactor Zn, kedua molekul ini dihilangkan.



Gambar 6. Dari data PDB terdapat air dan cofactor Zn, kedua molekul ini dihilangkan.

Komplek ligan-protein dibuat dengan melakukan *docking* dengan senyawa pembandingnya dan dipilih *pose* energi yang paling rendah.

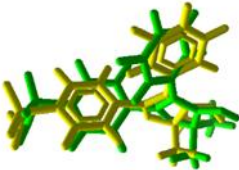
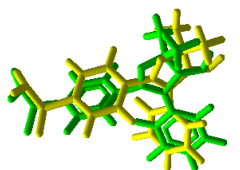
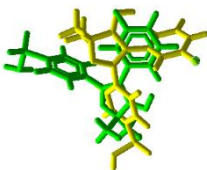
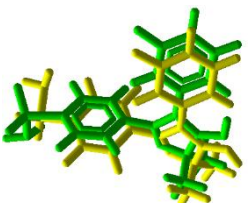
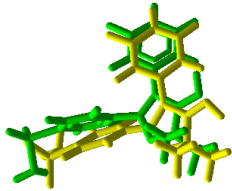
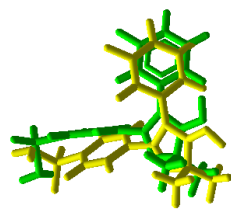
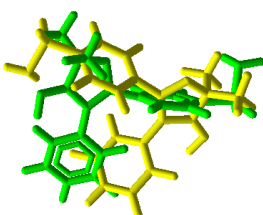
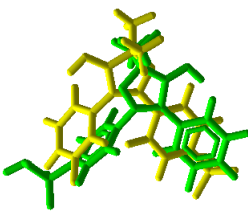
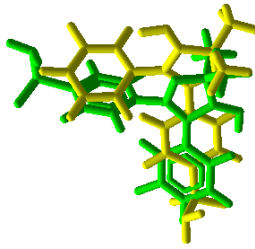
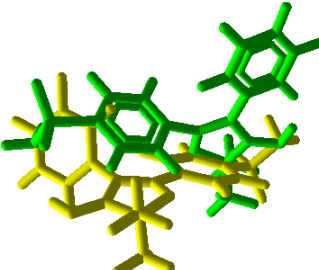
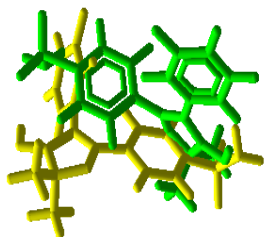
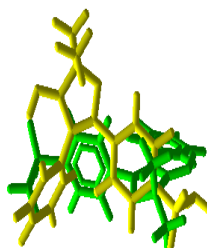


Gambar 7. Hasil kompleks terbaru dari MOE yang digunakan untuk validasi metode *docking*

Validasi protokol *docking* dengan RMSD untuk prediksi *pose*

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan proses pemisahan reseptor target dengan ligan alami (*re-docking*), kemudian dilakukan simulasi penambatan molekuler kembali. Keberhasilan dari proses *re-docking* ini dapat dilakukan dengan mengamati nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Nilai RMSD merupakan parameter yang menunjukkan seberapa besar perubahan interaksi pada struktur kristal sebelum dan sesudah proses *re-docking*. Bertujuan untuk membuktikan apakah metode penambatan yang digunakan dapat memprediksi bagaimana orientasi ligan terhadap reseptor. Molegro divalidasi dengan melakukan *redocking* ligan alami Polmacoxib pada *Carbonic anhydrase*. Selanjutnya dihitung nilai RMSD dari *pose* ligan terbaik hasil *redocking* tersebut hasil dari metode yang digunakan terhadap konformasi ligan alami. Suatu parameter dikatakan memenuhi persyaratan validasi metode apabila hasil proses *re-docking* memiliki nilai RMSD kurang dari 2 Å (Hevener et al., 2009).

Tabel.1 Hasil Redocking

<i>RMSD (Angstrom)</i>	MolDock Optimizer	MolDock SE	Iterated Simplex
MolDock Score	1.13	1.13	5
			
MolDock Score (Grid)	1.29	1.33	1.50
			
PLANTS Score	7.09	5.72	6.15
			
PLANTS Score (Grid)	7.27	7.27	7.27
			

Penambatan molekul dilakukan terhadap senyawa- senyawa dengan kombinasi *MolDock Score-MolDock Optimizer*, sesuai dengan hasil validasi metode yang diperoleh sebelumnya. Sebanyak 10 senyawa dengan *docking score* terendah dipilih untuk analisis selanjutnya.

Tabel 2. Hasil analisis dengan menggunakan protokol yang telah tervalidasi

No	Nama Senyawa	Rerank Score
1	7-Phloroecol	-95.5025
2	Asam Klorogenat	-91.5586
3	Asam Sargahidrokuinat	-95.5436
4	Dieckol	-93.7007
5	Diphlorethohydroxycarmalol	-88.1126
6	Eckol	-95.8593
7	Eckstolonol	-86.9893
8	Fukosterol	-97.1561
9	Stigmasterol	-87.1797
10	Trephloroethol	-100.319
Training Set		
1	Celecoxib	-87.2772
2	Polmacoxib	-87.2772

Kesepuluh senyawa diatas diprediksi aktif sebagai ligan terhadap *carbonic anhydrase* dan memiliki nilai *binding affinity lebih kecil dibandingkan ligan pembanding* Celecoxib dan Polmacoxib. Berdasarkan data ligan interaction diatas senyawa uji memiliki interaksi terhadap *Carbonic anhydrase II*. Interaksi tersebut khususnya terlihat pada jenis ikatan, dan jarak ikatan yang terbentuk, secara umum data tersebut dapat dijabarkan sebagai berikut. Secara keseluruhan, atom spesifik dari Polmacoxib yang berinteraksi dengan Carbonic anhidrase adalah atom oksigen dan hidrogen yang berada dekat atom N. Adanya beberapa cincin dalam suatu senyawa memberikan pengaruh terhadap interaksi yaitu interaksi terhadap cincin tersebut menjadi tidak spesifik hal tersebut dapat terjadi karena antara cincin-cincin tersebut memiliki elektronegatifitas yang hampir sama. Oleh karena itu, terdapatnya suatu gugus fungsional pada suatu cincin akan memberikan pengaruh keelektronegatifan yang baik sehingga interaksi terhadap salah satu cincin menjadi lebih spesifik. Akan tetapi, pada kondisi residu reseptor yang berbeda maka interaksinya akan berbeda pula. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya pengaruh lingkungan reseptor terhadap ligan.

KESIMPULAN

Reranke score senyawa Trephloroethol, Fukosterol, Eckol, AsamSargahidrokuinat, 7-Phloroecol, Dieckol, Asam Klorogenat,Diphlorethohydroxycarmalol dan Stigmasterol lebih kecil dibandingkan ligan alami Polmacoxib. Sehingga ditarik kesimpulan bahwa senyawa senyawa tersebut mempunyai aktifitas yang baik untuk berikatan dengan *Carbonic anhydrase II*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Profesor Siswandono dari Universitas Airlangga atas izin penggunaan (perangkat lunak Molegro Virtual Docker Ver. 6.0.). Terima kasih kepada Associate Professor Dr.apr.Esthi Mumpuni, M.Si untuk dukungan *Graphic Processing Unit* pada Superkomputer dan pemberian lisensi YASARA Dinamis

DAFTAR PUSTAKA

- Banerjee P., Eckert O.A., Schrey A.K., Preissner R.: ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res (Web server issue 2018)*; NAR
- Banerjee P, Dehnbostel F.O and Preissner R : Prediction is a Balancing Act: Importance of Sampling Methods to Balance Sensitivity and Specificity of Predictive Models based on Imbalanced Chemical Data Sets *Front. Chem*
- Drwal M.N., Banerjee P., Dunkel M., Wettig M.R., Preissner R.: ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity *Nucleic Acids Res (Web server issue 2014)*; NAR
- S. Kim, W. Lee, G. Bae, and Y. Kee, "Anti-diabetic and hypolipidemic effects of Sargassum yezoense in db/db mice," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 424, no. 4, pp. 675–680, 2012.
- B. Park et al., "Anti-platelet Aggregation and Anti-thrombotic Effects of Marine Natural Products Sargahydroquinonic Acid and Sargaquinonic Acid," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 34, no. 10, pp. 3121–3124, 2013.
- Chan, H.C.S., Shan, H., Dahoun, T., Vogel, H., Yuan, S., 2019. *Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. Trends in Pharmacological Sciences* 40, 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.06.004>
- Grimes, L., & T Young, M. (2015). Purinergic P2X receptors: structural and functional features depicted by X-ray and molecular modelling studies. *Current medicinal chemistry*, 22(7), 783-798. <https://doi.org/10.2174/0929867321999141212131457>
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., Simmerling, C., 2006. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, 712–725. <https://doi.org/10.1002/prot.21123>
- Okur, A., Strockbine, B., Hornak, V., Simmerling, C., 2002. Using PC clusters to evaluate the transferability of molecular mechanics force fields for proteins. *Journal of Computational Chemistry* 24, 21–31. <https://doi.org/10.1002/jcc.10184>

- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26, 283–291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- Ducrot, L., Bennett, M., André-Leroux, G., Elisée, E., Marynberg, S., Fossey-Jouenne, A., Zaparucha, A., Grogan, G., Vergne-Vaxelaire, C., 2022. Expanding the Substrate Scope of Native Amine Dehydrogenases through In Silico Structural Exploration and Targeted Protein Engineering. *ChemCatChem* 14. <https://doi.org/10.1002/cctc.202200880>
- Schweiker, S.S., Levonis, S.M., 2020. A quick guide to producing a virtual chemistry course for online education. *Future Medicinal Chemistry* 12, 1289–1291. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0103>
- Baker, C.M., 2015. Polarizable force fields for molecular dynamics simulations of biomolecules. *WIREs Computational Molecular Science* 5, 241–254. <https://doi.org/10.1002/wcms.1215>
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E., 2009. Computational structural biology – methods and applications, edited by T. Schwede and M. Peitsch. *Crystallography Reviews* 16, 303–306. <https://doi.org/10.1080/08893110903162063>
- Schmidt, T., Bergner, A., Schwede, T., 2014. Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design. *Drug Discovery Today* 19, 890–897. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.10.027>
- Valdés-Tresanco, M.S., Valdés-Tresanco, M.E., Valiente, P.A., Moreno, E., 2021. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation* 17, 6281–6291. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>
- Pieper, U., Webb, B.M., Dong, G.Q., Schneidman-Duhovny, D., Fan, H., Kim, S.J., Khuri, N., Spill, Y.G., Weinkam, P., Hammel, M., Tainer, J.A., Nilges, M., Sali, A., 2013. ModBase, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Research* 42, D336–D346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1144>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303 (2018). *Nucleic Acids Research*, Volume 45, Issue D1, January 2017, Pages D313–D319, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313-D319 (2017).
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumienny, G., Haas, J., Schwede, T. QMEANDisCo - distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* 36, 1765-1771 (2020).
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* 7 (2017).