

Analisis *In Silico* Senyawa Flavonoid Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) pada Reseptor α -Amilase Sebagai Antihiperqlikemik

(*In silico* Analysis of Secang Wood (*Caesalpinia Sappan* L.) Flavonoid Compounds on α -Amylase Receptors as Antihyperqlikemik)

Indah Kurnia Klara¹, Rini Madyastuti Purwono^{2*}, Pudji Achmadi³

¹Program Sarjana, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor

²Sub-divisi Farmasi Veteriner, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Institut Pertanian Bogor

³Divisi Fisiologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor

*Penulis untuk koresponden : rinipurwono@gmail.com

Diterima: 6 Juni 2023, Disetujui: 4 Oktober 2023

ABSTRAK

Pengujian *in vitro* dan *in vivo* kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebagai antihiperqlikemik sudah dilakukan sebelumnya dan memberikan hasil yang efektif, namun mekanismenya pada hewan belum diketahui. Penelitian ini bertujuan menganalisis mekanisme senyawa metabolit kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang dapat menghambat enzim α -amilase pada hewan melalui penambatan molekuler secara *in silico*. Profil farmakokinetik ligan diprediksi berdasarkan aturan Lipinski. Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan *admetSAR*. Reseptor diperoleh dari basis data PDB (ID 1OSE). Ligan pembanding yang digunakan adalah akarbosa. Penambatan molekuler dilakukan dengan menambatkan ligan uji *brazilin*, *protosappanin B*, *protosappanin C*, dan *sappanchalcone* pada enzim α -amilase menggunakan *Autodock Vina*. Penambatan molekuler dianalisis dengan energi ikatan (ΔG), konstanta inhibisi, serta ikatan kimia. Hasil penambatan molekuler menunjukkan semua ligan uji memiliki potensi sebagai antihiperqlikemik. Ligan uji *brazilin* memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase lebih baik daripada akarbosa berdasarkan nilai ΔG dan %BSS.

Kata kunci : α -amilase, antihiperqlikemik, *Caesalpinia sappan* L., penambatan molekuler

ABSTRACT

In vitro and *in vivo* assessments on secang wood (*Caesalpinia sappan* L.) as antihyperglycemic had been done before and given effective results, but the mechanism in the animals is unknown. This study aims to analyze the mechanism of secang wood (*Caesalpinia sappan* L.) metabolic compounds that can inhibit the α -amylase enzyme in animals through *in silico* molecular docking. Ligand pharmacokinetic profiles were predicted based on Lipinski's rules. Prediction of ligand toxicity was performed using *admetSAR*. The receptor was obtained from the PDB database with ID 1OSE. The comparative ligand used was acarbose. Molecular docking was performed by tethering the test ligands *brazilin*, *protosappanin B*, *protosappanin C*, and *sappanchalcone* to the α -amylase enzyme using *Autodock Vina*. Molecular docking is analyzed by binding affinity (ΔG), inhibition constant, and chemical bonds. The molecular docking results showed that all of the tested ligands had the potential as antihyperglycemic. The *brazilin*-tested ligand had better α -amylase inhibitory activity than acarbose based on ΔG and % BSS values.

Keywords: α -amylase, antihyperglycemic, *Caesalpinia sappan* L., molecular docking

PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan penyakit gangguan metabolisme akibat resistensi insulin atau penurunan fungsi pankreas dalam memproduksi hormon insulin. Resistensi insulin yang semakin berat dan lama menyebabkan sel β – pankreas akan kehilangan fungsinya sehingga glukosa tidak dapat diubah menjadi glikogen. Hal tersebut mengakibatkan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga glukosa darah meningkat (Rahman *et al.*, 2019; Yusuf dan Wati, 2019). Penyakit ini ditandai dengan hiperglikemia, yaitu peningkatan kadar gula darah yang melebihi batas normal (Putra dan Saraswati, 2021). Penyakit ini dapat terjadi pada manusia maupun pada hewan, seperti pada anjing dan kucing (Niaz *et al.*, 2018).

Diabetes melitus (DM) pada manusia memiliki kemiripan dengan DM pada hewan, seperti pada anjing dan kucing. Diabetes melitus pada kucing identik dengan DM tipe 2 pada manusia sedangkan DM pada anjing umumnya sama dengan DM tipe 1 pada manusia, namun kasus DM pada anjing lebih tinggi kejadiannya dibandingkan pada kucing (Nelson dan Reusch, 2014; Maylina *et al.*, 2023). Kasus diabetes melitus pada hewan di Indonesia belum mendapatkan perhatian yang bisa dibuktikan dengan minimnya data mengenai penyakit ini dan kesadaran masyarakat tentang pentingnya kesehatan hewan yang masih kurang (Dewi, 2017).

Salah satu pendekatan pengobatan DM adalah dengan menghambat enzim pencernaan karbohidrat, yaitu enzim α -amilase. Enzim α -amilase akan menghidrolisis karbohidrat menjadi disakarida, seperti maltosa dan glukosa yang nantinya akan terserap di dinding usus halus dan sebagian akan tersalur ke otak melalui *blood brain barrier* (BBB). Konversi yang berlebihan akan meningkatkan kadar glukosa darah dan glukosa *postprandial* sehingga enzim ini perlu dihambat (Watcharachaisoponsiri *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2021). Penghambatan terhadap enzim tersebut akan mengurangi kadar glukosa darah dengan menekan proses pencernaan karbohidrat (Chukwuma *et al.*, 2022). Mazumdar *et al.* (2020) mengungkapkan bahwa penghambatan terhadap enzim α -amilase lebih baik daripada enzim α -glukosidase dalam menekan hiperglikemia *postprandial* karena mencegah akumulasi maltosa yang berlebihan.

Obat yang biasa digunakan sebagai inhibitor α -amilase adalah akarbosa yang bekerja dengan memperlambat absorpsi glukosa melalui penghambatan enzim yang menghidrolisis karbohidrat, termasuk enzim ini (Wardani *et al.*, 2017). Penggunaan antidiabetes sintetik seperti *acarbose* seringkali menimbulkan efek samping seperti perut kembung, diare, dan sakit perut. Pengobatan DM

juga memakan waktu yang lama dan biaya yang tinggi (Marín-Peñalver *et al.*, 2016; Sarjono dan Tukiran, 2021; Sugiharto *et al.*, 2021). Faktor-faktor tersebut menjadikan penggunaan herbal untuk pengobatan DM dipilih karena efek samping yang ditimbulkan lebih minim dan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan menggunakan obat sintetik (Margono dan Sumiati, 2019; Intan dan Silvia, 2021).

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati yang melimpah dan sebagian besar tanaman diantaranya dimanfaatkan sebagai obat (Maftucha *et al.*, 2022). Tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan salah satu tanaman herbal yang secara empiris telah digunakan untuk pengobatan DM (Sarjono dan Tukiran 2021). Penelitian Arsiningtyas (2015) mengungkapkan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam kayu secang seperti brazilin dan *sappanchalcone* memiliki aktivitas sebagai antihiperglikemik secara *in vitro*. Penelitian Maghfiroh (2020) juga mengemukakan bahwa senyawa brazilin, protosappanin, dan *sappanchalcone* dari ekstrak kayu secang mampu menghambat enzim α -amilase.

Pembuktian secara ilmiah terhadap tanaman obat/herbal perlu dilakukan, salah satunya adalah dengan memanfaatkan teknologi komputer. Metode yang digunakan salah satunya adalah kajian secara *in silico*. Kajian *in silico* dilakukan untuk meningkatkan efisiensi proses perancangan obat (*drug design*) dengan memanfaatkan komputer. Kajian *in silico* melibatkan basis data dengan struktur molekul yang relevan lalu ditambahkan pada target protein (Malau dan Azzahra, 2019). Kajian *in silico* juga merupakan salah satu bentuk penerapan etika penggunaan hewan coba (3R), yaitu *replacement*. *Replacement* diartikan sebagai penggunaan sistem tidak hidup sebagai alternatif seperti penggunaan model komputer atau bisa berupa penggantian hewan vertebrata menjadi invertebrata seperti penggunaan kultur sel dan jaringan (Yurista *et al.*, 2017). Belum adanya studi *in silico* terhadap kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebagai antihiperglikemik ini diharapkan dapat memberikan jawaban mekanisme kayu secang sebagai antihiperglikemik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah file ligan dan enzim α -amilase (kode PDB: 1OSE) dengan format PDB (*.pdb) dan PDBQT (*.pdbqt), struktur kimia *brazilin*, *protosappanin B*, *protosappanin C*, dan *sappanchalcone* sebagai ligan uji dan akarbosa sebagai ligan pembanding.

Persiapan Protein Reseptor

Reseptor yang digunakan adalah enzim α -amilase. Struktur 3D reseptor diunduh melalui website *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)* dan disimpan dalam format file PDB (*.pdb). Reseptor selanjutnya dipreparasi dengan menggunakan perangkat *Discovery Studios 2016* dan *Autodock Vina Tools 1.5.6* yang kemudian file tersebut disimpan dalam format PDBQT (*.pdbqt) (Sari et al., 2020; Kamble et al., 2022).

Persiapan Ligan

Struktur 3D senyawa aktif ekstrak kayu secang yaitu *brazilin*, *sappanchalcone*, *protosappanin B* dan *protosappanin C*, sebagai ligan uji dan struktur obat akarbosa diperoleh dari *PubChem* kemudian disimpan dalam format SDF (*.sdf) dan dikonversi ke dalam format file PDB menggunakan *Discovery Studios 2016* (Kamble et al., 2022).

Analisis Stabilitas dan Toksisitas Ligan

Prediksi farmakokinetik ligan dan toksisitas dilakukan pada semua ligan uji dan ligan pembanding. Keseluruhan struktur ligan tersebut diunduh pada laman *PubChem* dalam format SMILES. Prediksi bioaktivitas ligan dilakukan dengan menggunakan aturan Lipinski. Prediksi tersebut dilakukan menggunakan *software online SCFBio*. Toksisitas ligan diprediksi menggunakan *software online admetSAR* dengan menggunakan parameter karsinogenisitas dan toksisitas akut oral. Ligan dalam format SMILES diunggah dalam laman tersebut dan data hasil prediksi bioaktivitas serta toksisitas ligan tersebut muncul setelah beberapa saat (Kalontong et al., 2022).

Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi penambatan molekuler dilakukan menggunakan *Autodock Vina Tools 1.5.6* pada reseptor α -amilase dengan ligan alami menggunakan spasi 1 Å. File konfigurasi (*conf*) dibuat dengan memasukkan nama reseptor, ligan, ukuran *box*, *center box*, serta mengatur jumlah energi dan jumlah mode yang digunakan. Validasi menggunakan *Command Prompt (cmd)* dengan pengulangan sebanyak 20 kali. Data hasil penambatan molekuler diperoleh file *out* dengan format file PDBQT dan log dengan format TXT (*.txt). Data hasil penambatan molekuler dibuka menggunakan *Ligplot+* atau *PyMOL*. Validasi metode penambatan dilakukan dengan melihat nilai *Root Mean Square Deviation (RMSD)*. Parameter penambatan molekuler dikatakan valid apabila nilai $RMSD < 2,0 \text{ \AA}$ (Sari et al., 2020).

<http://www.journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones>

Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler dilakukan menggunakan program *Autodock Vina Tools 1.5.6*. Koordinat *grid box* ditentukan berdasarkan koordinat ko-kristal dari file reseptor yang digunakan saat validasi. Ukuran *grid box* yang digunakan adalah $x = 36,853$, $y = 37,773$, dan $z = 3,837$, sementara ukuran dimensi x,y,z masing-masing 20,20,20 dengan spasi 1 Å. Proses penambatan molekuler dilakukan sesuai dengan parameter pada validasi metode penambatan molekuler. Penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan *Command Prompt (cmd)* (Sari et al., 2020).

Visualisasi Interaksi Reseptor – Ligan

Visualisasi kompleks ligan uji-reseptor yang paling mendekati model interaksi ligan kontrol-reseptor menggunakan *Ligplot+* dan *PyMol*. Area penambatan divisualisasikan dengan *Ligplot+* dalam bentuk 2D serta *PyMol* dalam bentuk 3D. Area penambatan terbaik dianalisis ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik dengan menggunakan *software Ligplot+* (Sari et al., 2020; Ferdian et al., 2021).

Analisis Energi Afinitas, Konstanta Inhibisi, Dan Ikatan Kimia

Analisis hasil penambatan molekuler dapat dengan melihat energi bebas Gibbs / energi afinitas (ΔG), nilai konstanta inhibisi, ikatan hidrogen dan kemiripan residu asam amino dari masing-masing ligan uji. Data perubahan energi afinitas digunakan untuk menentukan konstanta inhibisi ligan (Kalontong et al., 2022).

Analisis Data

Data bioaktivitas ligan, RMSD, energi bebas Gibbs/ energi afinitas (ΔG), konstanta inhibisi, dan kesamaan ikatan kimia dianalisis dengan metode deskriptif.

HASIL

Struktur dan Stabilitas Ligan

Struktur dan stabilitas ligan berpengaruh terhadap potensi penghambatan suatu protein seperti enzim. Terdapat 5 ligan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 4 ligan uji dan 1 ligan pembanding. Ligan uji yang digunakan merupakan senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*). Ligan yang berpotensi sebagai obat harus memenuhi aturan Lipinski. Aturan ini meliputi berat molekuler atau massa atom relatif < 500 Dalton (Da),

akseptor ikatan hidrogen < 10, donor ikatan hidrogen < 5, nilai logP -0,4 - 5, dan nilai refraktivitas molar yang berkisar antara 40 - 130. Ligan uji *brazilin* memenuhi semua aturan Lipinski. Ligan uji *sappanchalcone*, *protosappanin B* dan *protosappanin C* memiliki jumlah donor ikatan hidrogen yang tidak memenuhi syarat dalam aturan Lipinski. Ligan pembanding akarbosa tidak memenuhi aturan Lipinski. Ligan ini memiliki berat molekul (BM) sebesar 645 Da, jumlah donor ikatan hidrogen adalah 14, jumlah akseptor ikatan hidrogen 19, nilai logP -8,5645 dan nilai refraktivitas molar 137,735 (Tabel 1).

Toksistas Ligan

Hasil analisis toksistas pada ligan pembanding dan semua ligan uji menunjukkan skor tertinggi untuk toksistas oral akut (LD_{50}) diperoleh dari ligan pembanding akarbosa sebesar 0,6165 dan skor terendah diperoleh dari ligan uji *brazilin* yaitu sebesar 0,4369. Ligan pembanding akarbosa termasuk kedalam kategori IV dengan $LD_{50} > 5000$ mg/kg. Semua ligan uji termasuk kedalam kategori III ($500 < LD_{50} \leq 5000$ mg/kg). Prediksi karsinogenisitas yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ligan pembanding akarbosa dan semua ligan uji termasuk senyawa non karsinogen (Tabel 2).

Validasi Penambatan Molekuler

Validasi penambatan molekul dilakukan dengan menambatkan ulang ligan akarbosa dengan reseptor α -amilase (kode PDB: 1OSE) yang telah dipreparasi sebanyak 20 kali ulangan dengan *grid box* yang digunakan adalah $x = 36,381$, $y = 37,773$, dan $z = 3,837$, sementara ukuran dimensi x, y, z masing-masing 20,20,20 dengan spasi 1 Å.

Metode penambatan molekul dikatakan valid jika nilai *Root Mean Standard Deviation* (RMSD) < 2 Å. Nilai RMSD yang semakin kecil menunjukkan posisi ligan hasil penambatan molekul ulang semakin mendekati posisi ligan hasil kristalografi. Visualisasi hasil validasi menunjukkan perbandingan posisi ligan sebelum *docking* dan ligan hasil penambatan. Hasil validasi pada reseptor α -amilase (Gambar 1) yang menampilkan posisi terbaik ligan alami karena antara ligan alami sebelum (kuning) dan sesudah (magenta) saling bertumpang tindih. Hasil validasi menunjukkan nilai RMSD terkecil sebesar 0,7950 Å yang memiliki nilai < 2 Å. Hasil tersebut diartikan bahwa ukuran dan koordinat *grid box* dapat digunakan untuk *docking* senyawa uji.

Hasil Penambatan Molekuler

Penambatan molekul menghasilkan nilai energi bebas Gibbs / energi afinitas (ΔG) yang menunjukkan kekuatan ikatan dari interaksi ligan dan reseptor yang terbentuk. Nilai ΔG yang semakin kecil menunjukkan bahwa ikatan yang terbentuk antara ligan dengan reseptor semakin kuat. Ligan pembanding akarbosa memiliki nilai ΔG sebesar -7,0 kkal/mol. Semua senyawa flavonoid kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang digunakan dalam penelitian ini memiliki nilai ΔG yang lebih rendah dari ligan pembanding. Ligan uji *brazilin* dan *protosappanin B* memiliki nilai ΔG paling rendah yaitu -7,9 kkal/mol. Hasil penambatan molekul menunjukkan ligan uji *brazilin* dan *protosappanin B* memiliki nilai K_i terendah yaitu sebesar 1,595 μM (Tabel 3).

Suatu ikatan yang kuat tidak hanya ditandai dengan semakin kecilnya nilai ΔG dan K_i , kesamaan dan cakupan situs pengikatan yang ditunjukkan dengan parameter *binding site similarity* (% BSS) antara reseptor dan ligan uji dibandingkan dengan ligan pembanding akarbosa yang merupakan inhibitor enzim α -amilase. Ligan yang memiliki kesamaan ikatan residu asam amino yang mendekati ligan pembanding akarbosa diprediksi sebagai inhibitor potensial. Analisis % BSS terhadap ligan uji *brazilin*, *protosappanin B*, dan *sappanchalcone* menunjukkan nilai % BSS yang lebih dari 50 % sehingga diprediksi berpotensi untuk menghambat reseptor enzim α -amilase (kode PDB: 1OSE) dengan kuat (Tabel 3).

Kekuatan interaksi antara ligan dan reseptor juga dipengaruhi oleh ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan jarak antar ikatan hidrogen. Hasil visualisasi 2D dan 3D (Gambar 2 dan Gambar 3) menunjukkan semua ligan senyawa flavonoid kayu secang mampu berinteraksi dengan enzim α -amilase baik melalui ikatan hidrogen maupun interaksi hidrofobik (Tabel 3).



Gambar 1 Ilustrasi tumpang tindih ligan alami sebelum (kuning) dan sesudah (magenta) redocking.

Tabel 1 Hasil analisis stabilitas akarbosa dan ligan uji dari senyawa flavonoid ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan aturan Lipinski

Nama Ligan	BM (Da)	HBD	HBA	LogP	Refraktivitas Molar
Akarbosa	645*	14*	19*	-8,5645*	137,735*
Brazilin	286	4	5	1,3822	72,937
Protosappanin B	304	6*	5	1,1287	78,107
Protosappanin C	302	6*	4	1,335	77,085
Sappanchalcone	286	5*	3	2,7080	77,794

Keterangan: Berat Molekul (BM), *hydrogen bound donor* (HBD), *hydrogen bound acceptor* (HBA), * tidak memenuhi aturan Lipinski

Tabel 2 Hasil analisis toksisitas akarbosa dan ligan uji dari senyawa flavonoid ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.)

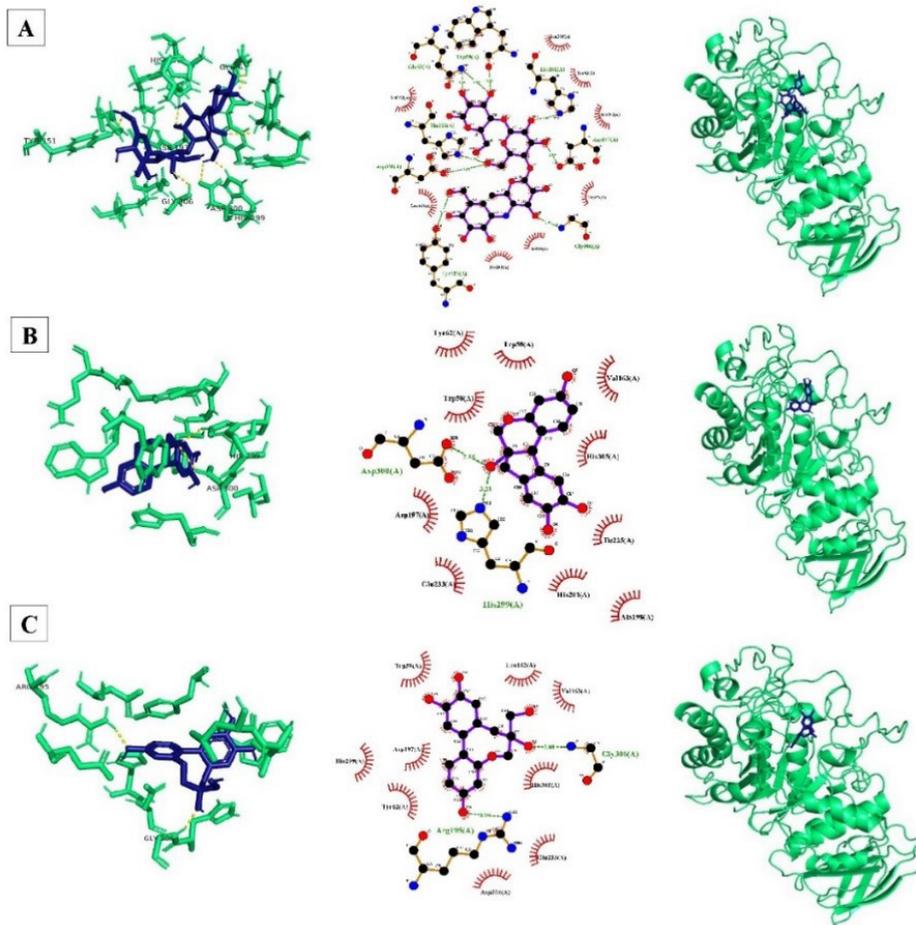
Nama Ligan	Parameter Toksisitas			
	Toksisitas Oral Akut (LD ₅₀)		Karsinogenesisitas	
	Kategori	Skor	Kategori	Skor
Akarbosa	IV	0,6165	-	0,6405
Brazilin	III	0,4369	-	0,5244
Protosappanin B	III	0,4354	-	0,4367
Protosappanin C	III	0,4779	-	0,4930
Sappanchalcone	III	0,5917	-	0,5567

Keterangan : Kategori LD₅₀ (kategori I LD₅₀ ≤ 50 mg/kg, kategori II (50 < LD₅₀ ≤ 500 mg/kg, kategori III 500 < LD₅₀ ≤ 5000 mg/kg, kategori IV LD₅₀ > 5000 mg/kg)

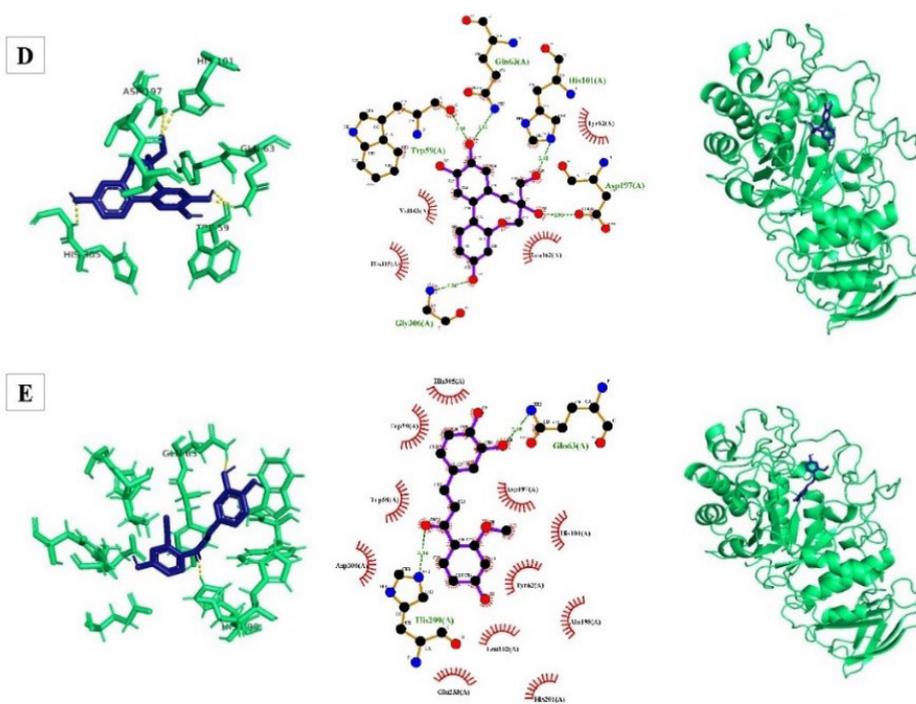
Tabel 3 Hasil penambatan molekuler akarbosa dan ligan uji dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap enzim α-amilase

Nama Ligan	ΔG (kkal/mol)	Ki (μM)	Residu asam amino berikatan hidrogen	Jarak ikatan (Å)	Residu Asam Amino Hidrofobik	% BSS
Akarbosa (pembanding)	-7,0	7,299	Trp59	2,83	Trp58, Tyr62, Leu162, Val163, Leu165, Ala198, His201, Glu233 Ile235	100
			Gln63	2,84		
				3,03		
			His101	3,09		
			Tyr151	3,01		
			Asp197	2,98		
			His299	2,75		
Asp300	3,28					
Gly306	2,95					
Brazilin	-7,9	1,595	His299*	3,21	Trp58*, Trp59*, Tyr62*, Val163*, Asp197*, Ala1988, His 201*, Glu233*, Ile235*, His305	64,7
			Asp300*	2,86		
Protosappanin B	-7,9	1,595	Arg195	3,08	Trp59*, Tyr62*, Leu162*, Val163*, Asp197*, Glu233*, His299*, Asp300*, His305	52,9
			Gly306*	3,20		
Protosappanin C	-7,7	2,236	Trp59*	2,94	Tyr62*, Leu162*, Val163*, His305	47
			Gln63*	3,12		
			His101*	2,92		
			Asp197*	2,93		
Gly306*	3,24					
Sappanchalcone	-7,8	1,889	Gln63*	2,98	Trp58*, Trp59*, Tyr62*, His101*, Leu162*, Asp197*, Ala198*, His201*, Glu233*, Asp300*, His305	70
			His299*	3,16		

Keterangan : Energi bebas Gibbs/energi afinitas (ΔG); konstanta inhibisi (Ki); * residu asam amino yang berikatan sama dengan ligan pembanding (akarbosa); *binding site similarity* (%BSS).



Gambar 2 Visualisasi 2D dan 3D ligan pembanding akarbosa (A) dan ligan uji senyawa flavonoid kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yaitu brazilin (B), dan protosappanin B (C)



Gambar 3 Visualisasi 2D dan 3D ligan pembanding akarbosa (A) dan ligan uji senyawa flavonoid kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yaitu protosappanin C (D) dan sappanchalcone (E)

PEMBAHASAN

Pengecekan dari sifat-sifat ligan pembanding (akarbose) dan ligan uji (*brazilin*, *protosappanin B*, *protosappanin C*, dan *sappanchalcone*) dilakukan dengan uji Lipinski (Fakhruri et al. 2021). Aturan Lipinski digunakan dalam memperkirakan kelarutan dan permeabilitas senyawa serta memprediksi kualifikasi sebagai kandidat obat apakah senyawa tersebut aktif secara oral atau tidak. Aturan ini memiliki lima parameter yang harus dipenuhi yaitu berat molekul < 500 Da, nilai logP -0,4 - 5, jumlah donor ikatan hidrogen < 5, jumlah akseptor ikatan hidrogen < 10, dan nilai refraktivitas molar yang berkisar antara 40-130. Senyawa yang dikategorikan sebagai molekul obat diprediksi mampu menembus membran pencernaan dan membran sel serta dapat mencapai protein target dengan mudah apabila memenuhi aturan ini. (Lipinski et al., 2012).

Senyawa yang memiliki berat molekul > 500 Da akan sulit untuk berdifusi menembus membran sel, sedangkan senyawa dengan berat molekul < 500 Da akan lebih mudah untuk berdifusi dalam tubuh. Massa atom relatif atau berat molekul mempengaruhi penyerapan obat di dalam tubuh. Berat molekul suatu senyawa atau obat yang semakin besar menyebabkan kemampuan senyawa atau obat terserap di dalam tubuh juga semakin rendah (Fakhruri et al., 2021). Semua ligan uji penelitian ini memiliki berat molekul < 500 Da sedangkan ligan pembanding akarbose memiliki berat molekul > 500 Da yaitu sebesar 645 Da (Tabel 1).

Jumlah donor ikatan hidrogen < 5 dan akseptor ikatan hidrogen < 10 menunjukkan bahwa semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen suatu senyawa, semakin tinggi pula energi yang dibutuhkan dalam terjadinya proses absorpsi (Fakhruri et al., 2021). Ligan uji *brazilin* dan *sappanchalcone* memiliki jumlah donor ikatan hidrogen < 5, kecuali ligan pembanding akarbose serta ligan uji *protosappanin B* dan *protosappanin C*. Semua ligan uji penelitian ini memiliki jumlah akseptor ikatan hidrogen < 10 yang artinya memenuhi syarat aturan Lipinski. Jumlah akseptor ikatan hidrogen yang dimiliki ligan pembanding akarbose > 10 yaitu 19 (Tabel 1).

Nilai logP menyatakan koefisien kelarutan suatu molekul atau senyawa obat dalam lemak/air yang memiliki rentang nilai -0,4 - 5. Nilai logP berhubungan dengan hidrofobitas molekul obat. Nilai logP yang semakin besar menandakan semakin hidrofobik suatu molekul atau senyawa obat. Molekul atau senyawa obat yang memiliki sifat hidrofobik yang tinggi cenderung memiliki toksisitas yang tinggi karena akan tertahan lebih lama pada lipid bilayer dan akan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh. Nilai logP yang

terlalu negatif menyebabkan molekul tidak dapat melewati membran lipid bilayer (Maftucha et al., 2022). Semua ligan uji dalam penelitian ini memiliki nilai logP yang memenuhi aturan Lipinski sedangkan ligan pembanding tidak memenuhi syarat tersebut (Tabel 1).

Suatu senyawa atau obat dikatakan memenuhi aturan Lipinski apabila terdapat tidak lebih dari dua aturan Lipinski yang tidak sesuai (Kalontong et al., 2022). Ligan uji *brazilin* memenuhi semua syarat aturan Lipinski. Ligan uji *sappanchalcone*, *protosappanin B* dan *protosappanin C* tidak memenuhi satu aturan Lipinski. Hal tersebut menunjukkan bahwa semua ligan uji pada penelitian ini memenuhi aturan Lipinski dan *brazilin* dipilih sebagai kandidat agen antihiperlipidemik paling potensial. Ligan pembanding akarbose tidak memenuhi semua aturan Lipinski, artinya ligan ini memiliki kelarutan dan permeabilitas yang buruk (Benet et al., 2016). Penelitian Clissold dan Edwards (1988) mengungkapkan bahwa akarbose dapat menurunkan kadar gula darah penderita DM secara signifikan pada dosis 100 - 200 mg. Hal tersebut bisa diartikan bahwa akarbose masih digunakan dalam penambatan molekuler meskipun tidak memenuhi aturan Lipinski.

Toksisitas merupakan salah satu kriteria yang perlu dicermati dalam pemilihan kandidat obat agar aman digunakan. Parameter toksisitas yang digunakan dalam penelitian ini meliputi toksisitas oral akut dan karsinogenisitas yang diprediksi menggunakan admetSAR. Karsinogenisitas menggambarkan potensi senyawa dalam menyebabkan tumor dan kanker pada manusia. *International Agency of Research on Cancer* (IARC) mengklasifikasikan suatu senyawa menjadi empat golongan yaitu karsinogenik pada manusia (golongan 1), senyawa yang mungkin memiliki sifat karsinogenik (golongan 2), senyawa yang tidak terklasifikasi atau tidak dapat ditentukan karsinogenisitasnya (golongan 3), dan senyawa non karsinogenik (golongan 4) (Fakhruri et al., 2021). Hasil analisis karsinogenisitas pada semua ligan yang digunakan tergolong sebagai senyawa non karsinogenik (Tabel 2).

Toksisitas oral akut menunjukkan sifat toksik akut dari senyawa atau obat yang masuk secara oral. Uji toksisitas oral akut dilakukan untuk mengukur derajat toksik suatu senyawa dalam waktu 24 jam (Fakhruri et al. 2021). Tingkatan toksisitas berdasarkan LD₅₀ terbagi menjadi empat kategori yaitu kategori I (toksik dengan LD₅₀ ≤ 50 mg/kg), kategori II (*warning*, 50 < LD₅₀ ≤ 500 mg/kg), kategori III (*caution*, 500 < LD₅₀ ≤ 5000 mg/kg), dan kategori IV (*nonrequired*, tidak toksik dengan LD₅₀ > 5000 mg/kg) (Ferdian et al., 2021).

Menurut Guan et al. (2019), senyawa yang termasuk

dalam kategori I dan II dianggap sebagai senyawa yang toksik sedangkan senyawa yang termasuk dalam kategori III dan IV merupakan senyawa yang non toksik. Hasil analisis toksisitas oral akut menunjukkan semua ligan uji termasuk ke dalam kategori III sementara ligan pembanding akarbosa termasuk ke dalam kategori IV (Tabel 2) yang termasuk ke dalam senyawa non toksik.

Penambatan molekuler akan akurat apabila parameter sesuai atau mendekati dengan keadaan sebenarnya. Validasi penambatan molekul dilakukan sebelum simulasi terhadap senyawa uji dengan melihat nilai *Root Mean Standard Deviation* (RMSD). *Grid box* didefinisikan sebagai dimensi sisi aktif makromolekul berupa kubus yang memiliki ukuran dan posisi tertentu untuk ruang penambatan ligan. Ukuran dan posisi *grid box* dipresentasikan dengan koordinat x, y, dan z yang diatur dengan spasi (jarak) tertentu. Nilai RMSD menunjukkan tingkat akurasi sebuah metode penambatan molekul (La Kilo et al., 2019).

Metode penambatan molekul dikatakan valid jika nilai RMSD < 2 Å (Sari dan Suhartati, 2016; Fakhruri et al., 2021). Validasi enzim α -amilase menggunakan penambatan molekuler dengan akarbosa yang berperan sebagai inhibitor enzim ini. Nilai RMSD terkecil dari hasil validasi sebesar 0,7950 Å yang berarti parameter (*grid box*) metode penambatan molekul yang digunakan memenuhi syarat. Nilai RMSD yang semakin kecil menunjukkan posisi ligan hasil penambatan molekul ulang semakin mendekati posisi ligan hasil kristalografi (Nursamsiar et al., 2020). Hasil validasi metode penambatan molekuler selanjutnya digunakan untuk penambatan molekuler menggunakan ligan pembanding dan ligan uji.

Penambatan molekuler pada penelitian ini dilakukan untuk menemukan inhibitor enzim α -amilase sebagai obat antihiperlipidemik dari kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan dibandingkan dengan akarbosa yang merupakan inhibitor α -amilase komersial. Ligan uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan senyawa flavonoid dari ekstrak kayu secang yaitu, *brazilin*, *protosappanin B*, *protosappanin C*, dan *sappanchalcone*. Parameter yang dianalisis pada penelitian ini meliputi nilai energi bebas Gibbs/energi afinitas (ΔG), ikatan hidrogen, serta kemiripan residu asam amino dari masing-masing ligan uji.

Energi bebas Gibbs/energi afinitas (ΔG) diperoleh dari hasil penambatan molekuler. Nilai ΔG merupakan parameter kestabilan konformasi antara ligan dan reseptor yang juga adalah prediktor spontanitas suatu reaksi. Nilai ΔG negatif diartikan bahwa suatu reaksi terjadi secara spontan sedangkan nilai ΔG yang positif menandakan bahwa reaksi terjadi tidak spontan. Energi afinitas (ΔG) dihasilkan ketika kompleks ligan-

reseptor yang terbentuk dapat menunjukkan afinitas ligan terhadap reseptornya. Nilai ΔG yang rendah menunjukkan afinitas ligan terhadap reseptor tinggi, sebaliknya jika nilai ΔG tinggi afinitas ligan terhadap reseptor rendah. Analisis konstanta inhibisi (K_i) juga dilakukan untuk mengetahui daya hambat suatu senyawa terhadap reseptornya. Nilai K_i yang semakin kecil menandakan semakin kuat hambatan senyawa. Nilai ΔG hasil penambatan molekuler yang semakin kecil menyebabkan nilai K_i juga akan semakin kecil. Kedua parameter ini dapat menjadi acuan dalam menentukan senyawa terbaik (Kalontong et al., 2022).

Ligan pembanding akarbosa memiliki nilai ΔG sebesar -7,0 kkal/mol. Semua senyawa flavonoid yang menjadi ligan uji pada penelitian ini memiliki nilai afinitas energi yang lebih rendah dari ligan pembanding, yaitu *brazilin*, *protosappanin B*, *protosappanin C*, dan *sappanchalcone*. *Brazilin* dan *protosappanin B* memiliki nilai ΔG paling negatif dari ligan lainnya termasuk ligan pembanding akarbosa yaitu sebesar -7,9 kkal/mol serta nilai K_i sebesar 1,595 (Tabel 3). Kedua ligan tersebut diartikan memiliki stabilitas konformasi mendekati akarbosa yang lebih baik dibandingkan dengan ligan uji lainnya. Nilai ΔG dan K_i yang berbanding lurus diartikan bahwa *brazilin* dan *protosappanin B* memiliki aktivitas penghambatan terhadap α -amilase juga mendekati akarbosa.

Visualisasi hasil penambatan molekuler perlu dilakukan untuk melihat hasil penambatan ligan pembanding dan ligan uji terhadap reseptor α -amilase yang digunakan serta untuk menganalisis interaksi dan jenis ikatan ligan-reseptor. Ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, serta jarak ikatan hidrogen menjadi parameter kekuatan interaksi antara ligan dan reseptor. *Binding site similarity* (% BSS) adalah parameter yang digunakan untuk melihat kemiripan residu asam amino antara ligan pembanding dan ligan uji. Ikatan hidrogen merupakan interaksi asam amino yang berperan dalam menstabilkan interaksi antara ligan dan reseptor. Ikatan hidrogen yang stabil memiliki panjang ikatan < 2,7 Å. Interaksi hidrofobik adalah interaksi asam amino pada ligan dan reseptor yang berguna dalam mempertahankan konformasi pengikatan (Fakhruri et al., 2021; Kalontong et al., 2022).

Hasil visualisasi 2D dan 3D menunjukkan bahwa semua senyawa flavonoid kayu secang yang digunakan sebagai ligan uji mampu berinteraksi dengan sisi aktif enzim α -amilase. Residu asam amino yang berperan sebagai residu katalitik dari enzim α -amilase adalah Asp197, Glu233, dan Asp300. Residu Asp197 berperan sebagai nukleofilik katalitik dalam reaksi hidrolisis yang dilakukan oleh enzim α -amilase pada substrat polimerik seperti karbohidrat. Residu Asp300 sangat

penting dalam mengoptimalkan orientasi substrat terikat pada situs aktif yang berdekatan dengan residu katalis dan menstabilkan keadaan transisi (Nursamsiar et al., 2020). Residu Glu233 merupakan asam amino katalitik umum yang berperan dalam reaksi hidrolisis karbohidrat (Fujimoto et al., 1998).

Hasil penambatan molekuler menunjukkan akarbosa sebagai ligan pembanding berikatan hidrogen dengan residu Asp197 (2,98 Å) dan Asp300 (3,28 Å) dan berinteraksi hidrofobik dengan residu Glu233 pada sisi aktif enzim α -amilase. Ligan uji *brazilin* mampu berikatan hidrogen dengan residu Asp300 (2,86 Å) dan berinteraksi hidrofobik dengan residu Asp 197 dan Glu233 pada sisi aktif enzim α -amilase. Ligan uji *protosappanin B* hanya berikatan hidrogen dengan residu Asp197, Glu233, dan Asp300. Ligan uji *protosappanin C* berikatan hidrogen dengan residu Asp197 (2,93 Å) dan *sappanchalcone* juga hanya mampu berinteraksi hidrofobik dengan residu Asp 197, Glu233 dan Asp300 pada sisi aktif enzim α -amilase (Gambar 5, Tabel 3). Interaksi melalui ikatan hidrogen antara ligan uji dengan residu asam amino yang sama dengan ligan alami menunjukkan kemiripan jenis interaksi dalam hal ini menggambarkan kemiripan aktivitas (Nursamsiar et al., 2020). Ligan uji *brazilin* memiliki kekuatan interaksi ligan-reseptor yang paling mendekati ligan pembanding akarbosa.

Binding site similarity (% BSS) merupakan persentase kesamaan ikatan yang terbentuk antara reseptor dan ligan. Kesamaan dan cakupan area penambatan ikatan residu asam amino yang mendekati hingga lebih tinggi dari inhibitor α -amilase diprediksi sebagai inhibitor potensial (Ferdian et al. 2021). Hasil penambatan molekuler ligan pembanding akarbosa terhadap enzim α -amilase memiliki total 17 interaksi, 8 ikatan hidrogen dan 9 interaksi hidrofobik. Ligan uji *sappanchalcone* memiliki nilai % BSS tertinggi sebesar 70 %. Nilai % BSS *brazilin* adalah 64,7% dan *protosappanin B* dengan nilai sebesar 52,9 %. Ligan uji *protosappanin C* memiliki nilai % BSS terkecil yaitu sebesar 47 %. Ligan dengan % BSS lebih dari 50 % diperkirakan memiliki kemampuan inhibisi yang sama dengan ligan pembandingnya (Prayoga et al., 2020).

Sebanyak 4 ligan uji yang merupakan senyawa flavonoid kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) memiliki potensi sebagai antihiperlipidemia dengan menghambat enzim α -amilase. *Brazilin* merupakan ligan uji dengan aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase yang lebih baik dibandingkan akarbosa berdasarkan nilai energi afinitas (ΔG) dan *binding site similarity* (% BSS).

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini.”

DAFTAR PUSTAKA

- Arsiningtyas IS. 2015. Search for α -glucosidase inhibitors from Indonesian indigenous plants. Tesis S2. Hokkaido University. Hokkaido. p67-77
- Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. 2016. BDDCS, the rule of 5 and drugability. *Advance Drug Delivery Reviews*. 101:89–98.
- Chukwuma IF, Nworah FN, Apeh VO, Omeje KO, Nweze EJ, Asogwa CD, Ezeorba TPC. 2022. Phytochemical characterization, functional nutrition, and anti-diabetic potentials of *Leptadenia hastata* (pers) Decne leaves: in silico and in vitro studies. *Bioinformatics and Biology Insights*. 16:1-17
- Clissold SP, Edwards C. 1988. Akarbosa. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*. 35:214–243.
- Dewi K. 2017. Uji aktivitas ekstrak etanol kulit pisang mas (*Musa acuminata* (AA group)) terhadap penurunan glukosa darah mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi aloksan. Skripsi S1. Universitas Hasanuddin. Makassar.p1-3
- Fakhruri M, Rahmayanti Y, Isfanda. 2021. Potensi fitokimia *Citrus auranti.um* (hesperetin, naringenin) dalam menghambat xantin oxidase pada hiperurisemia secara *in silico*. *Jurnal Health Sains*. 2(1):79–89.
- Ferdian PR, Elfirta RR, Ikhwan AZN, Kasirah K, Haerul H, Sutardi D, Ruhiat G. 2021. Studi *in silico* senyawa fenolik madu sebagai kandidat inhibitor Mpro SARS-CoV-2. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 31(3):213–232.
- Fujimoto Z, Takase K, Doui N, Momma M, Matsumoto T, Mizuno H. 1998. Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *Journal of Molecular Biology*. 277(2):393–407.
- Guan L, Yang H, Cai Y, Sun L, Di P, Li W, Liu G, Tang Y. 2019. ADMET-score-a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Medicinal Chemistry Communication*. 10(1):148–157.
- Intan EK, Silvia M. 2021. Pharmacological activities of *Caesalpinia sappan*. *Jurnal Info Kesehatan*. 11(1):363–369.
- Kalontong PK, Safithri M, Tarman K. 2022. Penambatan molekul senyawa aktif *Spirulina platensis* sebagai inhibitor TMPRSS2 untuk mencegah infeksi SARS-COV-2. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(2):253–267.
- Kamble RP, Ghosh P, Kulkarni AA. 2022. Identification of α -amylase inhibitory compounds from leaves of *Careya arborea* Roxb. and in silico docking studies. *South African Journal of Botany*. 00:1–11.
- Kaur N, Kumar V, Nayak SK, Wadhwa P, Kaur P, Sahu

- SK. 2021. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: a comprehensive review. *Chemical Biology and Drug Design*. 98(4):539–560.
- La Kilo A, Aman LO, Sabihi I, La Kilo J. 2019. Studi potensi pirazolin terdistribusi 1-N dari tiosemikarbazon sebagai agen anti-amuba melalui uji *in silico*. *Indonesian Journal of Chemistry Research*. 7(1):9–16.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64:4–17.
- Maftucha N, Manalu TR, Amelia R, Cordia P, Bupu R. 2022. Potensi senyawa turunan xanton dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebagai inhibitor protein *Mycobacterium tuberculosis*: studi *in silico*. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. 7(2):123–128.
- Maghfiroh AN. 2020. Uji aktivitas antidiabetes ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) menggunakan metode inhibisi enzim alfa amilase secara *in vitro*. Skripsi S1. Universitas Jember. Jember. p1-52
- Malau ND, Azzahra SF. 2019. Analisa *docking cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)* terhadap reseptor *Plasmodium falciparum* Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR) sebagai anti malaria. *Jurnal EduMatSains*. 4(1):99–110.
- Margono RS, Sumiati T. 2019. Potensi tanaman Indonesia sebagai antidiabetes melalui mekanisme penghambatan enzim α -glukosidase. *Jurnal Farmamedika (Pharmamedica Journal)*. 4(2):86–92. doi:10.47219/ath.v4i2.84.
- Marín-Peñalver JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, Cañizo-Gómez FJ del. 2016. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal Diabetes*. 7(17):354. doi:10.4239/wjd.v7.i17.354.
- Maylina L, Sajuthi D, Wulandari R, Widodo S, Widhyari S, Esfandari A, Wijaya A, Choliq C. 2023. Diabetes mellitus pada kucing. <https://rshpfkh.ipb.ac.id/diabetes-mellitus-pada-kucing/>. Download: Maret 3, 2023.
- Mazumdar S, Marar T, Patki J, Devarajan S, Zambare V, Swami D. 2020. *In silico* and *in vitro* analysis reveal multi-target anti-hyperglycaemic properties of gedunin, a limonoid from neem (*Azadirachta indica*). *Clinical Phytoscience*. 6(1): 1-11.
- Nelson RW, Reusch CE. 2014. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *The Journal of Endocrinology*. 222(3):1–9.
- Niaz K, Maqbool F, Khan F, Hassan FI, Momtaz S, Abdollahi M. 2018. Comparative occurrence of diabetes in canine, feline, and few wild animals and their association with pancreatic diseases and ketoacidosis with therapeutic approach. *Veterinary World*. 11(4):410–422.
- Nursamsiar, Mangande MM, Awaluddin A, Nur S, Asnawi A. 2020. *In silico* study of aglycon curculigoside A and its derivatives as α -amilase inhibitors. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 7(1):29-37.
- Prayoga GR, Huda AS, Sitepu SB. 2020. The potency of senggani (*Melastoma malabathricum* L) leaves in repair of pancreatic beta cells for diabetes mellitus patients: a narrative review. *Current Biochemistry*. 7(2):61–70.
- Putra AAGM, Saraswati MR. 2021. Prevalensi diabetes melitus tipe 2 dengan hipertensi Di RSUP Sanglah Denpasar tahun 2015. *Jurnal Medika Udayana*. 10(6):61–63.
- Rahman MN, Sukmawati IR, Puspitasari IM. 2019. Pola penanda glikemik dan inflamasi dalam perkembangan penyakit diabetes melitus tipe 2 pada pria obesitas sentral. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*. 8(4):281-288.
- Sari IW, Junaidin J, Pratiwi D. 2020. Studi molekular *docking* senyawa flavonoid herba kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) pada reseptor α -glukosidase sebagai antidiabetes tipe 2. *Jurnal Farmagazine*. 7(2):54-60.
- Sari R, Suhartati. 2016. Secang (*Caesalpinia sappan* L.): tumbuhan herbal kaya antioksidan. *Info Teknis Eboni*. 13(1):57–67.
- Sarjono AK, Tukiran. 2021. Review potensi ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebagai antidiabetes mellitus. *UNESA Journal of Chemistry*. 10(3):307–317.
- Sugiharto MI, Bintari YR, Damayanti DS. 2021. Mekanisme senyawa aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) sebagai anti diabetes : studi *in silico*. *Jurnal Kedokteran Komunitas*. 9(2):1–13.
- Wardani NAK, Andini, Indriani PT, Sarinasiti DI. 2017. Enzim α -Amilase inhibitor pada ekstrak air kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) untuk penanggulangan diabetes melitus. *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian*. 1(2):50–59.
- Watcharachaisoponsiri T, Sornchan P, Charoenkiatkul S, Suttisansanee U. 2016. The α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity from different chili pepper extracts. *International Food Research Journal*. 23(4):1439–1445.
- Yurista SR, Ferdian RA, Sargowo D. 2017. Principles of the 3Rs and ARRIVE guidelines in animal research. *Indonesian Journal of Cardiology*. 37(3):156–63.
- Yusuf M, Wati A. 2019. Efek infus kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap penurunan kadar gula darah mencit (*Mus musculus*). *Media Farmasi*. 15(1):28–34.