

Four Compounds in *Aegle marmelos* are Potential as Antidiabetic by Targeting PPAR γ in silico

Broto Santoso¹ , Ratna Yuliani²

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia

² Department of Pharmaceutical Biology, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia

 Broto.Santoso@ums.ac.id

Abstract

The protein PPAR γ , which has 2 types of binding-site pockets as coactivators and corepressors, can be a target for type 2 antidiabetes. *Aegle marmelos* has been reported to contain 181 compounds, and some parts of this plant have antidiabetic activity. Dynamic interactions between PPAR γ and compounds contained in *A. marmelos* are believed to occur. This study aims to determine their *in silico* affinities. Initial preparation and modification of ligands and proteins have been conducted using protoss (proteins.plus) and UCSF chimera. The protein is conditioned with and without water content, which is actively involved in ligand-protein interactions. Molecular docking is performed using the standard SeeSAR mode. The obtained data represent a range between the lower and upper bounds of predicted affinity values, which are analyzed and presented alongside visual data on ligand-protein interactions. The results of this study indicate that almost half of the compounds contained in *A. marmelos* (48.1%) have a strong affinity for the coactivator-type binding-site pocket on PPAR γ , while 25.4% of the compounds interact with its corepressor-type, and the rest do not or have weak interactions with the binding-site pocket on PPAR γ . Fatty acid compounds have a strong affinity for both types of binding-site pockets on PPAR γ . Therefore, fatty acids might have no antidiabetic activity, which targets PPAR γ . There are 4 non-fatty acid compounds that only bind and interact with the coactivator-type on PPAR γ , namely *N*-[2-methoxy-2-[4-(3-methylbut-2-enoxy)phenyl]ethyl]-3-phenylprop-2-enamide, epoxyaurapten, 4-[2-(2,6-dimethoxy-4-prop-2-enylphenoxy)propyl]-2-methoxyphenol, and 7-(2,6,7-trihydroxy-7-methyl-3-methylideneoctoxy)chromen-2-one. Hence, these compounds might have antidiabetic activity. Further studies are needed to compare the antidiabetic activities of active compounds in *A. marmelos*, both individually and in combination.

Keywords: *Aegle marmelos*; PPAR γ ; SeeSAR

Empat Senyawa dalam *Aegle marmelos* Berpotensi sebagai Antidiabetes dengan Sasaran PPAR γ *in silico*

Abstrak

Protein PPAR γ yang mempunyai 2 tipe *binding-site pocket* sebagai koaktivator dan korepresor dapat menjadi target antidiabetes tipe 2. *Aegle marmelos* (maja) telah dilaporkan mengandung 181 senyawa dan beberapa bagian dari tanaman ini memiliki aktivitas antidiabetes. Interaksi dinamis antara PPAR γ dengan senyawa yang terkandung di dalam *A. marmelos* diduga dapat terjadi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan afinitas *in silico* keduanya. Preparasi awal dan modifikasi ligan dan protein telah dilakukan menggunakan protoss (proteins.plus) dan UCSF chimera. Protein dikondisikan dengan dan tanpa kandungan air yang aktif terhadap interaksi ligan-protein. Docking molekuler dilakukan menggunakan SeeSAR mode standar. Data yang diperoleh merupakan rentang antara batas bawah dan atas nilai prediksi afinitas yang dianalisis dan disajikan berdampingan dengan data visual interaksi ligan-protein. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hampir separuh dari jumlah senyawa yang terkandung dalam maja (48,1%) memiliki afinitas kuat terhadap *binding-site pocket* tipe koaktivator pada PPAR γ , sedangkan 25,4% senyawa cenderung berinteraksi dengan tipe

korepresornya, dan sisanya tidak atau berinteraksi lemah dengan *binding-site pocket* pada PPARG. Senyawa golongan asam lemak mempunyai afinitas kuat pada kedua tipe *binding-site pocket* PPARG. Oleh karena itu, asam lemak diduga kuat tidak memiliki aktivitas sebagai antidiabetes dengan target PPARG. Ada 4 senyawa non asam lemak yang hanya terikat dan berinteraksi kuat dengan PPARG tipe koaktivator, yaitu N-[2-metoksi-2-[4-(3-metilbut-2-enoksi)fenil]etil]-3-fenilprop-2-enamida, epoksiauraptin, 4-[2-(2,6-dimetoksi-4-prop-2-enilfenoksi)propil]-2-metoksifenol, dan 7-(2,6,7-trihidroksi-7-metil-3-metilideneoktoksi)kromen-2-on. Senyawa-senyawa tersebut diprediksi mempunyai aktivitas antidiabetes. Kajian lebih lanjut perlu dilakukan untuk membandingkan aktivitas antidiabetes senyawa aktif dalam maja baik tunggal maupun kombinasi.

Kata kunci: *Aegle marmelos*; PPARG; SeeSAR

1. Pendahuluan

Reseptor gamma dari peroksisom *proliferator-activated* (PPARG) adalah satu dari sekian protein target yang telah diidentifikasi untuk aktivitas antidiabetes. Shang et al. berhasil memperoleh 3 kristal protein ini dengan dua tipe *binding-site pocket* yang berbeda aktivitas kerjanya [1]. Tipe *pocket* ini diperoleh dari memodifikasi konformasi protein dengan penambahan peptida yang bertindak sebagai penentu konformasi *binding-site pocket* korepresor dan koaktivator protein bersama dengan senyawa aslinya (*native*). Salah satu poin penting dari temuan ini adalah bahwa protein target bisa menjadi aktif dan tidak aktif. Hal ini menarik untuk diujikan menggunakan senyawa alam dan ditentukan afinitas *in silico*.

Maja (*Aegle marmelos*) selain telah dilaporkan memiliki aktivitas antidiabetes [2], [3] dan juga didapati setidaknya 181 senyawa yang berhasil diidentifikasi dalam berbagai bagian dari tanaman [4]–[8]. Senyawa-senyawa ini ditemukan pada bagian daun, akar, getah, biji, kulit batang, dan buah dari tanaman maja. Sebagian besar senyawa tersebut termasuk dalam golongan senyawa terpenoid, lainnya terbagi ke dalam kelompok alkaloid, kumarin, fenolat, asam lemak, flavonoid, dan karetonoid. Interaksi antara senyawa dalam *A. marmelos* dengan 2 tipe *pocket* target PPARG diduga terjadi secara dinamis dan ditentukan oleh nilai resultan afinitasnya. Penelitian ini ditujukan untuk mendapatkan dan menentukan estimasi afinitas senyawa yang terkandung dalam *A. marmelos in silico*.

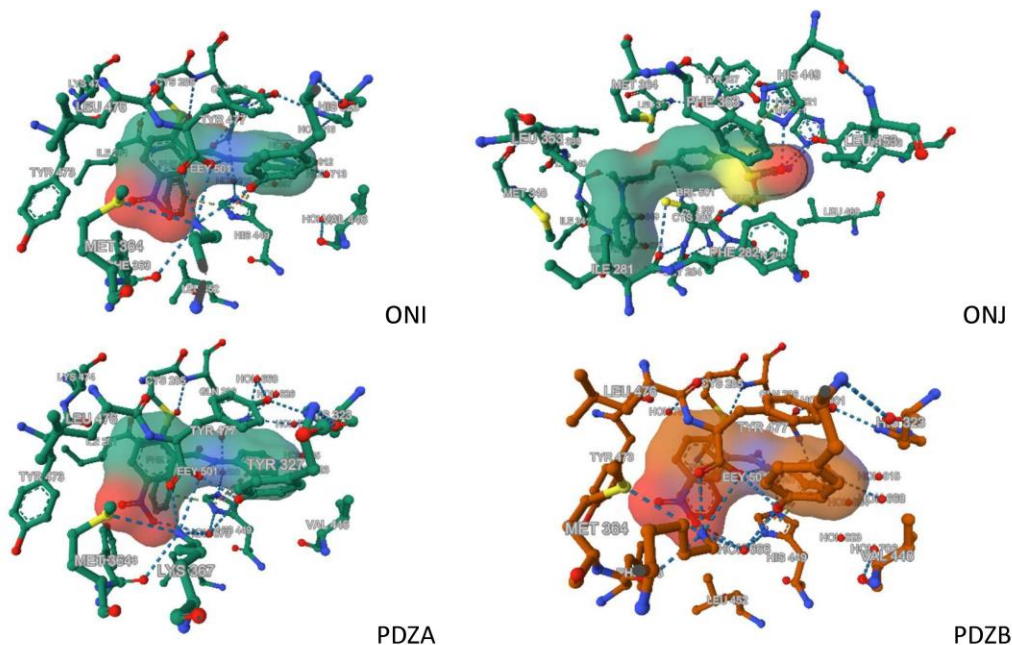
2. Metode

Langkah awal adalah ligan yang dimiliki *A. marmelos* ditelusur nomor identitas senyawa atau *compound identifier* (CID) dalam basis data PubChem [9] menggunakan kata kunci nama kimia atau SMILES senyawa dan diunduh berkas struktur tiga dimensinya (3D) dengan ekstensi sdf. Delapan senyawa yang tidak ditemukan dalam basis data PubChem dibuat struktur kimianya menggunakan aplikasi daring ChemAxon Marvin JS, dikonversi konformasi struktur 2D ke dalam bentuk 3D dan diunduh dalam ekstensi sdf. Semua berkas ini digabungkan ke dalam satu berkas berekstensi sdf. Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6ONI, 6ONJ, dan 6PDZ dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Identitas Protein Target Antidiabetes

PDB-ID	Resolusi (Å)	<i>Native</i>	IC ₅₀ (nM)	Tipe <i>Binding-site Pocket</i>
6ONI	1,8	EEY (CID-2777391)	1000	Korepresor
6ONJ	2,3	BRL (CID-445655)	298	Koaktivator
6PDZ	2,1	EEY (CID-2777391)	1000	Korepresor

Berkas protein ditambahkan atom hidrogen secara prediksi dengan menggunakan aplikasi web protoss di laman proteins.plus [10], [11]. Terdapat 2 native yang perlu dimodifikasi untuk memisahkan ikatan antara atom alkil dengan residu protein menggunakan bantuan UCSF chimera [12]. Molekul air yang aktif terlibat dalam interaksi ligan protein dipilih dan dipertahankan sebagai berkas protein dengan molekul air aktif dan digunakan pula protein yang telah dihilangkan semua molekul air dimana keduanya menjadi protein target. Total terdapat 8 berkas protein target yang digunakan dalam penelitian ini. Hal ini dikarenakan 6PDZ memiliki 2 rantai, yaitu A dan B. Residu penyusun *binding-site pocket* dan air aktif yang terlibat dalam interaksi *native* protein semua protein secara berurutan berjumlah 18-29 asam amino dan 1-8 molekul air. Konformasi 3D antara *native* dengan residu *binding-site pocket* ditunjukkan pada Gambar 1.



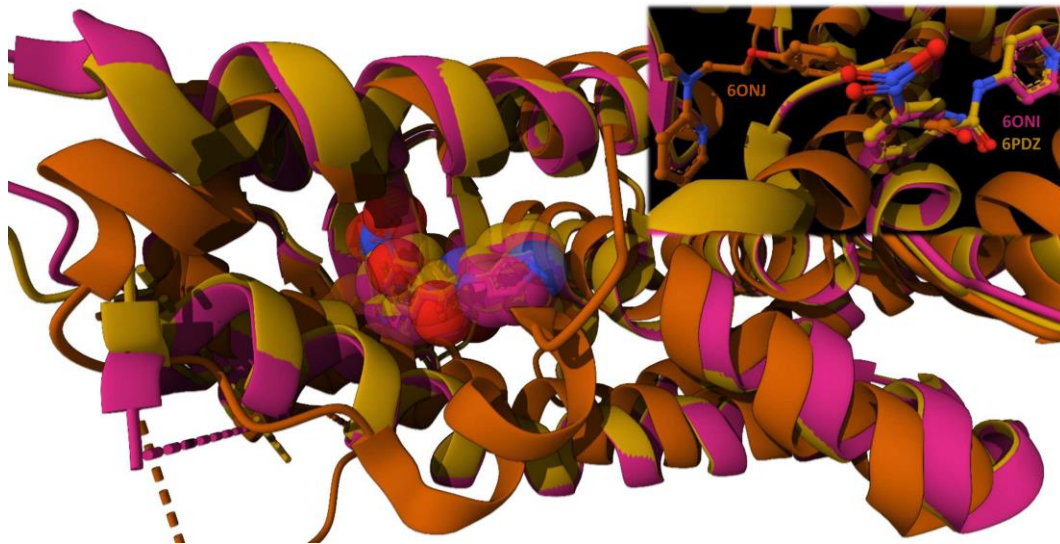
Gambar 1. Posisi ruang residu penyusun *binding-site pocket* dan air aktif terhadap *native* protein target yang dihasilkan dari aplikasi WebGL RCSB.

Docking molekuler protein dengan ligan dari *A. marmelos* dilakukan menggunakan SeeSAR mode standar dengan langkah secara berurutan, yaitu *load* berkas protein ke dalam SeeSAR menggunakan menu Protein, tentukan residu dan molekul air yang dilibatkan pada menu Binding Site, masuk ke dalam jendela Docking, load ligan yang akan diujikan dan tekan tombol standar untuk melakukan *docking* molekuler mode standar. Konformasi 3D ligan potensial yang diperoleh dilakukan kalkulasi Estimated affinity, H-bond network, Torsion quality, dan Determine clashes. Nilai afinitas prediksi interaksi berupa rentang antara batas bawah dan atas dalam satuan nM, dianalisis dan disajikan secara visual interaksi ligan-protein.

3. Hasil dan Pembahasan

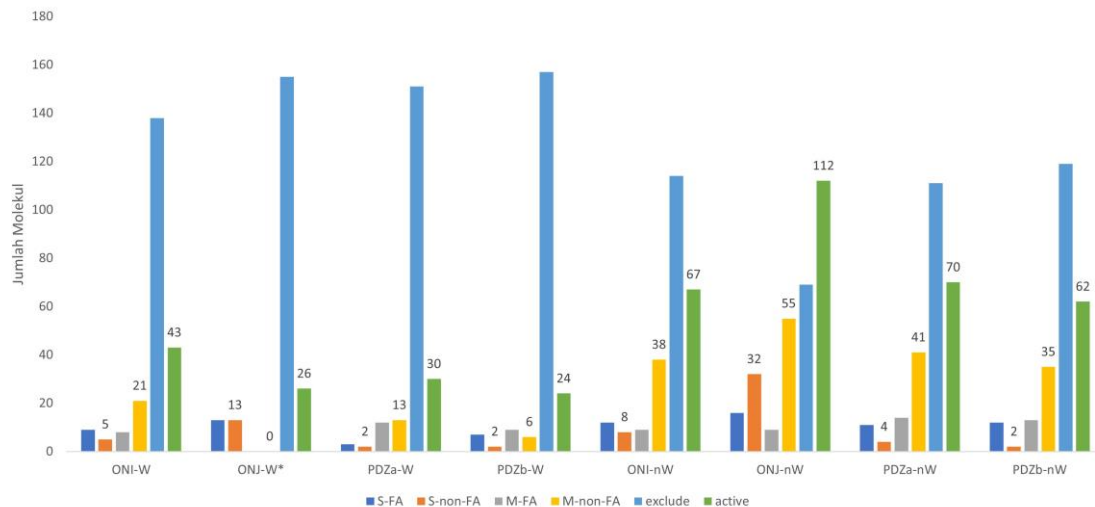
Konformasi ruang *native* dipengaruhi dan mempengaruhi bentuk *binding-site pocket* protein. Volume *pocket* adalah salah satu deskriptor yang harus digunakan dalam menentukan ligan yang akan diujikan. Hasil kesejajaran dari ketiga protein diperoleh dan diperlihatkan pada Gambar 2. Secara visual, 2-kloro-5-nitro-N-piridin-4-ilbenzamida (EEY), *native* dari 6ONI dan 6PDZ berada pada koordinat yang sama. Konformasi ruang

native ini berbeda jika dibandingkan dengan *native* 6ONJ, yaitu rosiglitazone (BRL). Kedua protein ini memiliki *binding-site pocket* yang bersifat represif terhadap aktivitas antidiabetes. Sebaliknya, *native* 6ONJ adalah senyawa aktif antidiabetes yang memiliki volume dan luas permukaan molekuler lebih besar. Volume *binding-site pocket* terbesar dimiliki oleh 6ONJ. Keberadaan air aktif membatasi ruang gerak konformasi dari *native* ketika komputasi *docking* dilakukan. Limitasi dari penelitian ini adalah dengan tidak adanya data hasil pengukuran kristalografi x-ray untuk ketiga protein ketika *native* yang digunakan sekarang ini dilakukan persilangan tempat. Rosiglitazone digunakan pada konformasi protein 6ONI dan 6PDZ atau sebaliknya. Hal ini digunakan untuk membandingkan kesesuaian prediksi *in silico* dengan hasil uji.



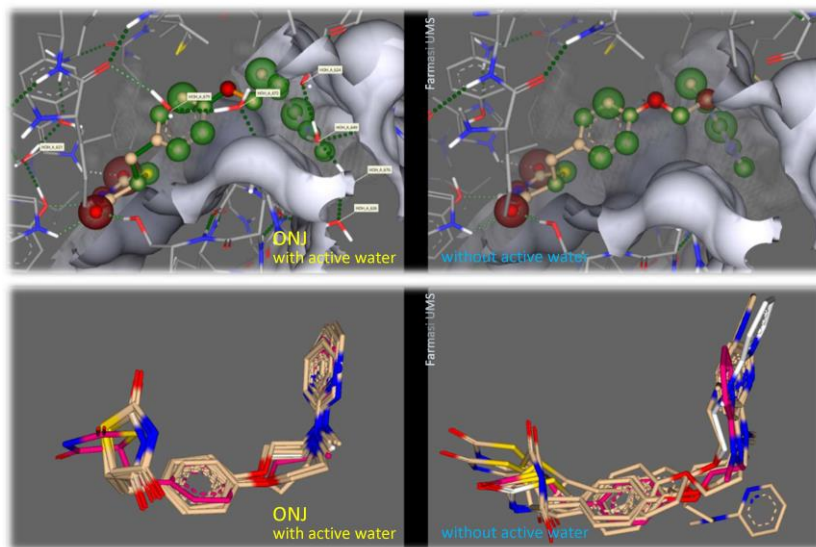
Gambar 2. Kesejajaran ruang *native* protein target yang dihasilkan dari aplikasi WebGL RCSB. Protein 6ONI berwarna merah muda, 6PDZ dan 6ONJ berurutan berwarna kuning emas dan coklat.

Adanya molekul air yang terekam aktif pada interaksi ligan protein dalam berkas kristalografi protein merupakan parameter penyaringan yang baik untuk mendapatkan kandidat senyawa baru yang potensial dengan aktivitas biologis. Sebaran pada Gambar 3 memperlihatkan bahwa jumlah senyawa aktif dengan adanya molekul air dalam *binding-site pocket* hanya seperempat dari jumlah senyawa yang tidak melibatkan molekul air. Konformasi hasil *docking* molekuler *native* menunjukkan kecenderungan kedekatan koordinat dengan kristal *native* (Gambar 4) ketika komponen air ini hadir.



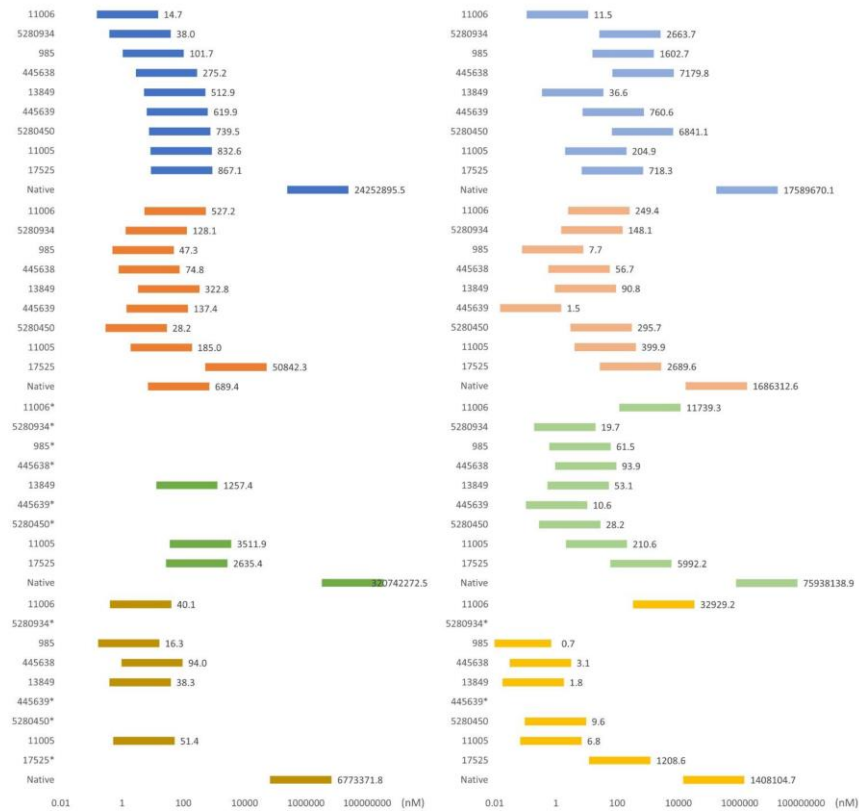
Gambar 3. Sebaran jumlah senyawa golongan asam lemak (FA) dan non asam lemak (non-FA) didasarkan pada prediksi afinitas terhadap protein target (W: air aktif dilibatkan, nW: sebaliknya). Kategori afinitas diduga kuat (S) untuk nilai minimal afinitas kurang dari 100 nM, menengah bila nilai maksimal afinitas kurang dari 1 mM dan di atas nilai minimal kategori kuat. *Exclude* diartikan untuk kelompok senyawa dengan afinitas lemah (bukan termasuk M atau S) atau bahkan tidak ada. Arti * adalah jumlah yang disajikan dalam grafik tidak mengikuti kaidah sebelumnya dan hanya senyawa dengan afinitas lebih baik dibandingkan *native* yang disertakan.

Molekul air ini berfungsi mendekatkan prediksi komputasi *docking* dengan kondisi sebenarnya ketika pengukuran kristalografi x-ray protein berhasil diabadikan dalam bentuk tiga dimensinya bersama dengan *native*. Hal ini juga mendukung tujuan dari validasi hasil *docking native* dibandingkan hasil kristalografinya. Sebaliknya, molekul air ini harus dihapuskan dari berkas protein jika ingin memaksimalkan penggunaan seluruh ruang *binding-site pocket* untuk interaksi ligan protein.



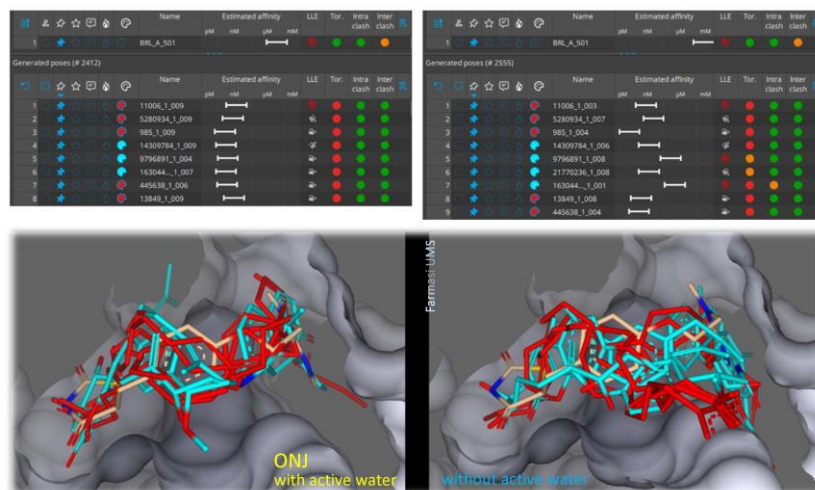
Gambar 4. Konformasi 3D hasil *docking* (bawah) dibandingkan dengan senyawa kristal dari *native* (atas). Senyawa *native* (merah muda), afinitas tertinggi (putih).

Keuntungan lainnya ketika molekul air tidak disertakan dalam *docking* adalah terjadinya peningkatan jumlah ligan yang mempunyai nilai afinitas tinggi (Gambar 3). Afinitas ikatan ditemukan menjadi lebih baik seperti yang terjadi pada beberapa senyawa kelompok asam lemak (Gambar 5). Hasil yang bias akan diperoleh seperti pada contoh kasus golongan asam lemak ini.



Gambar 5. Rentang nilai afinitas asam lemak terpilih di setiap protein target, 6ONI; 6PDZa; 6PDZb; dan 6ONJ secara berurut biru, hijau, kuning, dan coklat dengan molekul air (kanan) dan tidak (kiri).

Tipe *pocket* represif dan aktivator ini memudahkan untuk mengenali ligan yang potensial. Basis data protein yang ada belum mempunyai dua tipe ini untuk setiap data kristalografi protein yang berhasil disimpan. Asam lemak pada Gambar 5 mempunyai afinitas di dua tipe tersebut. Afinitas akhirnya ditentukan oleh resultan kedua afinitas di kedua tipe *pocket* PPARG. Temuan menariknya adalah dimungkinkan kondisi yang sama dapat terjadi pada protein target lainnya dan jumlah *rotatable* atom yang banyak seperti yang dimiliki oleh asam lemak menjadi penentu utama fleksibilitas ligan berinteraksi di dalam *binding-site pocket*. Kelompok ini dapat mengisi dan memenuhi ruang *pocket* dengan mudah (Gambar 5).



Gambar 6. Rentang nilai afinitas dan konformasi ruang senyawa asam lemak (merah), non asam lemak (cyan) terpilih, dan *native* pada binding-site pocket protein 6ONJ (aktif).

Atas dasar ini, senyawa non asam lemak ditelusur nilai afinitas terbaiknya yang hanya ada terjadi pada *pocket* aktif. Terdapat empat senyawa yang potensial, yaitu N-[2-metoksi-2-[4-(3-metilbut-2-enoksi)fenil]etil]-3-fenilprop-2-enamida (CID-163044515), epoksiaurapten (CID-9796891), 4-[2-(2,6-dimetoksi-4-prop-2-enilfenoksi)propil]-2-metoksifenol (CID-21770236), dan 7-(2,6,7-trihidroksi-7-metil-3-metilideneoktoksi)kromen-2-on (CID-14309784). Keempat senyawa ini tidak berhasil terikat di dalam *pocket* tipe refresif sehingga diduga mempunyai aktivitas antidiabetes. Aktivitas antidiabetes keempat senyawa ini yang terkandung dalam *A. marmelos* belum banyak ditemukan ketika dilakukan penelusuran literatur. Tantangan besar untuk penelitian aktivitas senyawa produk alam di laboratorium adalah mendapatkan senyawa target tersebut dalam jumlah yang cukup untuk digunakan pengujian.

4. Kesimpulan

Terdapat empat senyawa potensial yang terkandung dalam *A. marmelos* (maja) yang diprediksi mempunyai aktivitas antidiabetes. Kajian lebih lanjut harus dilakukan untuk menentukan manakah senyawa aktif dalam maja, tunggal maupun kombinasi dengan lainnya yang mempunyai aktivitas antidiabetes dan adanya analisis korelasi hasil dengan pendekatan *in silico*.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Fakultas Farmasi UMS untuk aplikasi SeeSAR yang berlisensi sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

Referensi

- [1] J. Shang *et al.*, "A molecular switch regulating transcriptional repression and activation of PPAR γ ," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 956, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14750-x.
- [2] R. Gupta, "Active phytoconstituents for diabetes management: A review," *J. Complement. Integr. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 1–18, 2018, doi: 10.1515/jcim-2017-0123.
- [3] N. Sharma *et al.*, "Aegle marmelos (L.) Correa: An Underutilized Fruit with High Nutraceutical Values: A Review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 18, 2022, doi: 10.3390/ijms231810889.
- [4] S. Monika, M. Thirumal, and P. R. Kumar, "Phytochemical and biological review of Aegle marmelos Linn," *Futur. Sci. OA*, vol. 9, no. 3, 2023, doi: 10.2144/fsoa-2022-0068.
- [5] R. Tiwari *et al.*, "Comprehensive chemo-profiling of coumarins enriched extract derived from Aegle marmelos (L.) Correa fruit pulp, as an anti-diabetic and anti-inflammatory agent," *Saudi Pharm. J.*, vol. 31, no. 9, p. 101708, 2023, doi: 10.1016/j.jsps.2023.101708.
- [6] M. Vaithiyalingam, C. Kamaraj, R. Mohankumar, S. Sarvesh, and P. Deepak, "Bioactive compound isolated from Aegle marmelos fruit pulp and semi-synthetic modifications: a Biological potential," *Biomass Convers. Biorefinery*, no. January 2023, 2022, doi: 10.1007/s13399-022-03538-2.
- [7] H. N. Murthy, M. A. Bhat, and D. Dalawai, "Bioactive Compounds of Bael (Aegle marmelos (L.) Correa)," *Ref. Ser. Phytochem.*, pp. 1–28, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-06120-3_35-1.
- [8] T. Sarkar, M. Salauddin, and R. Chakraborty, "In-depth pharmacological and nutritional properties of bael (Aegle marmelos): A critical review," *J. Agric. Food Res.*, vol. 2, no. October, p. 100081, 2020, doi: 10.1016/j.jafr.2020.100081.

- [9] S. Kim *et al.*, “PubChem 2023 update,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 51, no. D1, pp. D1373–D1380, 2023, doi: 10.1093/nar/gkac956.
- [10] T. Lippert and M. Rarey, “Fast automated placement of polar hydrogen atoms in protein-ligand complexes,” *J. Cheminform.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 2009, doi: 10.1186/1758-2946-1-13.
- [11] S. Bietz, S. Urbaczek, B. Schulz, and M. Rarey, “Protoss: A holistic approach to predict tautomers and protonation states in protein-ligand complexes,” *J. Cheminform.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-12.
- [12] E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)
