

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

1. Sistematika Tanaman Kelor

Sistem taksonomi tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) menurut (Integrated Taxonomy Information System. n.d.) sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Brassicales
Famili	: Moringaceae
Genus	: <i>Moringa</i>
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i> Lam.



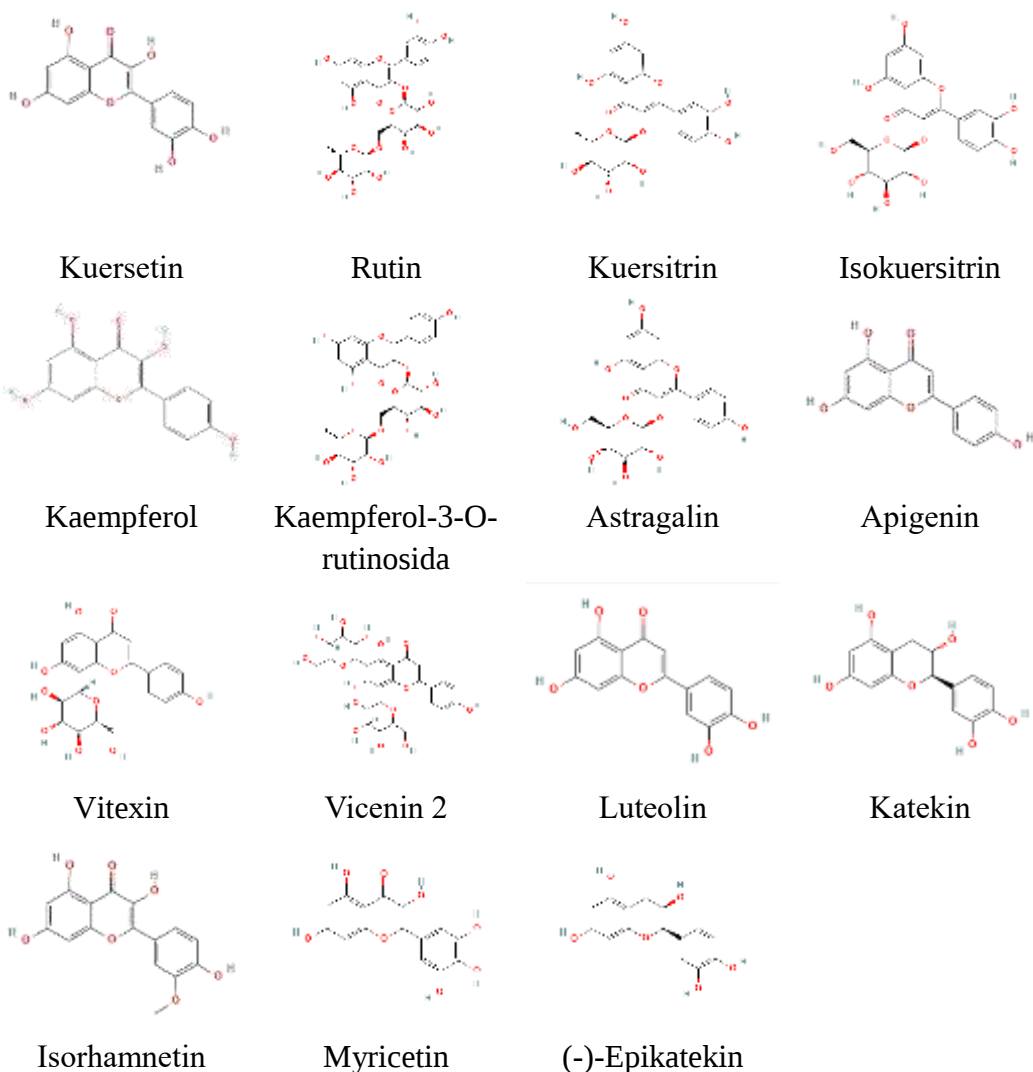
Gambar 1. Tanaman Kelor

2. Kandungan Kimia

Daun kelor mengandung berbagai senyawa kimia, salah satunya memiliki aktivitas sebagai antidiabetes. Informasi mengenai kandungan senyawa-senyawa tersebut diperoleh dari sumber seperti *web server* KNApSACk, PubChem, serta berbagai jurnal penelitian.

2.1 Golongan Flavonoid. Flavonoid merupakan sekelompok besar senyawa polifenol alami yang tersebar luas dalam berbagai tanaman. Flavonoid mencakup subkelas utama seperti flavon, flavonol, isoflavon, dan antosianidin yang memiliki variasi struktur dan bioaktif yang beragam. Flavonoid memiliki struktur dasar berupa 15 atom karbon

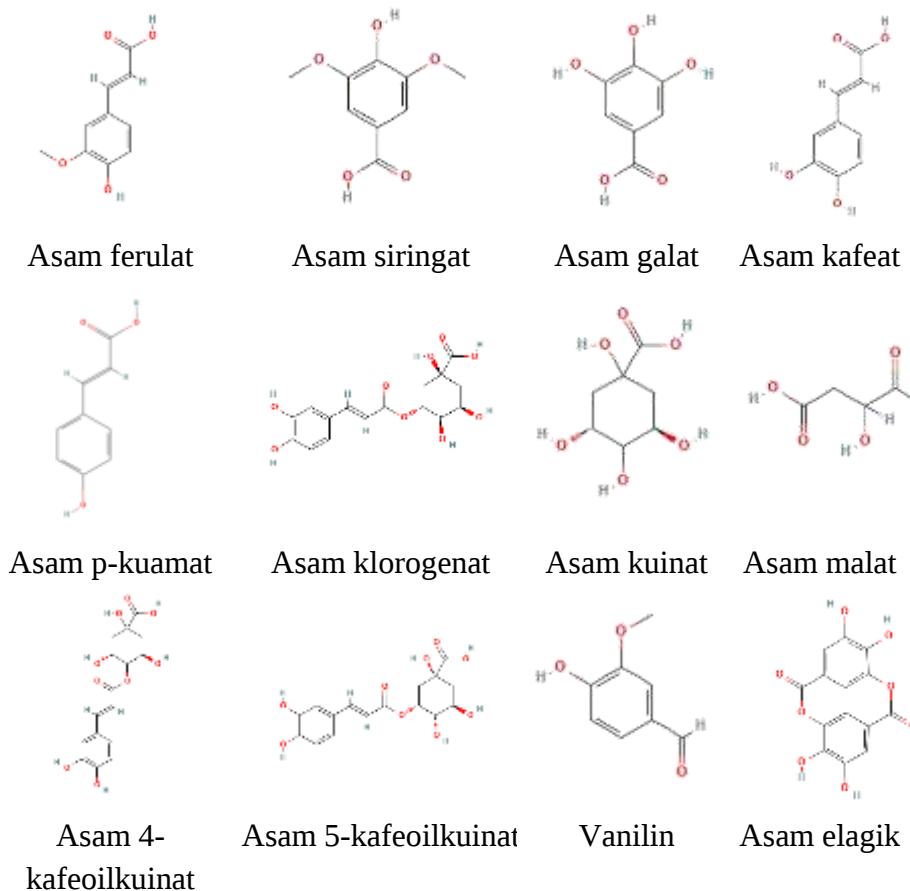
yang tersusun dari dua cincin aromatik (C6) yang dihubungkan oleh rantai karbon tiga (C3) (Dias *et al.*, 2021). Daun kelor telah diidentifikasi mengandung 15 senyawa flavonoid sesuai pada gambar 2.



Gambar 2. Senyawa kimia daun kelor flavonoid (Gao *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2023)

2.2 Golongan Asam Fenolik. Asam fenolik adalah senyawa fenolik yang memiliki satu gugus asam karboksilat (-COOH). Asam fenolik diklasifikasikan menjadi dua sub-kelompok utama, yaitu asam hidroksi benzoat memiliki struktur C6-C1 dan biasanya ditemukan dalam bentuk terkonjugasi dengan gula atau asam organik, contohnya adalah asam p-hidroksibenzoat, vanilat, dan siringat. Sementara itu, asam hidroksi sinamat memiliki struktur C6-C3, berasal dari asam sinamat, dan sering ditemukan sebagai ester sederhana dengan asam

kuinat atau glukosa (Kumar & Goel, 2019). Daun kelor telah diidentifikasi mengandung 12 senyawa asam fenolik sesuai pada gambar 3.

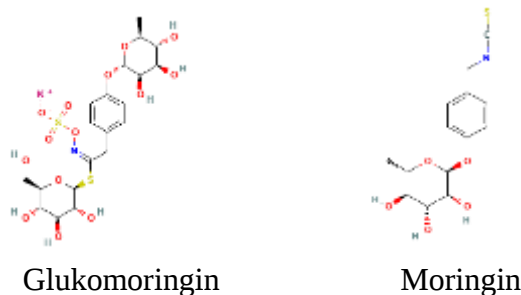


Gambar 3. Senyawa kimia daun kelor asam fenolik (Gao *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2023)

2.3 Golongan Glukosinolat dan Isotiosianat. Secara struktur, senyawa glukosinolat memiliki β -S-glukosida dari tio-oksime-O-sulfat dan berasal dari sintesis asam amino. Daun kelor mengandung senyawa glukosinolat yang dominan berupa Glukomoringin (4-(α -L-rhamnopyranosiloksi)benzil glukosinolat)) (Chodur *et al.*, 2018). Keberagaman senyawa ini berkontribusi terhadap aktivitas biologis dan potensi farmakologis daun kelor.

Isotiosianat merupakan senyawa yang terbentuk dari prekursor glukosinolat yaitu glukomoringin, melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim mirosinase. Mirosinase memecah glukosa yang terkait dengan tioglukosida dalam glukosinolat, meninggalkan aglikon yang dengan

cepat tersusun ulang untuk membentuk isotiosianat aktif. Salah satu senyawa isotiosianat yang ditemukan dalam daun kelor adalah 4-(α -L-rhamnopyranosiloksi)benzil isotiosianat (moringin) (Waterman *et al.*, 2014).



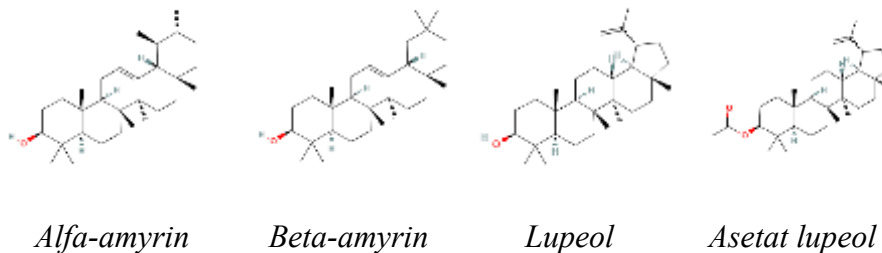
Gambar 4. Senyawa kimia daun kelor glukosinolat (Chodur *et al.*, 2018) dan isotiosianat (Waterman *et al.*, 2014)

2.4 Golongan Tiokarbamat. Tiokarbamat merupakan turunan dari karbamat yang memiliki gugus —NH—C(=S)—O— , di mana atom karbon dikaitkan dengan gugus sulfidik ($=\text{S}$) sebagai pengganti gugus karbonil pada karbamat biasa. Daun kelor telah diidentifikasi mengandung 3 senyawa tiokarbamat sesuai pada gambar 5.



Gambar 5. Senyawa kimia daun kelor tiokarbamat (Faizi *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 1998)

2.5 Golongan Triterpenoid. Senyawa triterpenoid merupakan senyawa alami terbentuk yang terdiri kondensasi 6 unit isoprena (C_5H_8) dan memiliki 30 atom karbon (C_{30}) (James & Dubery, 2009). Terdapat 4 senyawa kimia triterpenoid yang terkandung dalam daun kelor, yaitu α -amyrin, β -amyrin, lupeol, lupeol acetate (KNAPSAcK Core Database.,n.d).



Gambar 6. Senyawa kimia daun kelor triterpenoid (KNAPSAck)

3. Aktivitas Farmakologi

Tanaman *Moringa oleifera* L. yang dikenal dengan nama kelor dan disebut sebagai “pohon ajaib” karena kaya akan senyawa bioaktif yang telah banyak diteliti untuk farmakologisnya. Kelor telah digunakan selama bertahun-tahun untuk keperluan tradisional, pengobatan, dan industri. Bagian tanaman dimakan sebagai sayuran dan ditambahkan ke makanan sehari-hari untuk melawan beberapa penyakit. Daun kelor telah ditemukan sebagai makanan untuk melawan malnutrisi.

Daunnya memiliki potensi untuk menurunkan kadar glukosa darah melalui mekanisme yang melibatkan flavonoid, vitamin C, dan seng. Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan yang efektif mengurangi radikal bebas, melindungi dari kerusakan sel beta pankreas, serta meningkatkan sensitivitas insulin. Di sisi lain, vitamin C berperan penting dalam regenerasi sel dan peningkatan sistem kekebalan tubuh, sementara seng penting untuk sintesis dan sekresi insulin. Kombinasi sinergis ketiga senyawa ini membantu memperbaiki homeostasis glukosa dan fungsi pankreas, sehingga berdampak signifikan terhadap penurunan kadar glukosa darah puasa pada model hewan dengan hiperglikemia (Chairul *et al.*, 2024). Penelitian *in vivo* yang dilakukan oleh Aljazzaf *et al.* (2023) menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak daun dan biji kelor efektif menurunkan glukosa darah, kolesterol, trigliserida, serta memperbaiki histopatologi pankreas, hati, dan ginjal pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan.

Kandungan flavonoid dalam daun kelor diduga bekerja melalui mekanisme mirip sulfonilurea yaitu meningkatkan sekresi insulin dari sel beta pankreas melalui penutupan kanal K^+ (Toby *et al.*, 2020). Hasil penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Ojo & Ojo (2015) menunjukkan bahwa ekstrak aseton daun kelor meningkatkan sekresi insulin secara signifikan pada konsentrasi glukosa tinggi. Sekresi insulin meningkat hingga dua kali lipat saat dikombinasikan dengan IBMX

atau tolbutamid, Efek ini juga terbukti terhambat oleh diazoxide (*activator* saluran KATP) dan verapamil (penghambat saluran kalsium) yang menunjukkan bahwa aksi insulinotropik terjadi melalui jalur KATP *channel-dependent*. Sehingga ekstrak memicu depolarisasi membran sebesar 7,1 kali lipat dan peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler hingga 2,6 kali lipat pada sel β pankreas BRIN-BD11. Kelor juga dapat meningkatkan ekspresi GLUT4 di hati dan pankreas, yang berperan mengurangi resistensi insulin, meningkatkan pengambilan glukosa oleh jaringan, dan menurunkan kadar glukosa darah dengan menghambat produksi glukosa di hati (Adedapo *et al.*, 2020).

Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Swamy *et al.* (2022) bahwa senyawa astragalin yang diisolasi dari daun kelor terbukti secara *in vitro* meningkatkan sekresi adiponektin dan menurunkan leptin pada sel 3T3-L1. Kedua adipokin ini merupakan komponen penting dalam regulasi sensitivitas insulin dan keseimbangan energi metabolik yang biasanya dimediasi oleh jalur PPAR- γ . Hasil tersebut selaras dengan hasil penelitian *in vitro* Le *et al.* (2024) bahwa ekstrak daun kelor mampu meningkatkan diferensiasi adiponektin sebesar 4,34 kali lipat pada konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$ secara signifikan pada meningkatkan diferensiasi adiposit serta ekspresi gen adipogenik dan lipogenik seperti PPAR- γ , C/EBP α , *adiponectin*, FABP4, FAS, ACC, SCD1, dan SREBP1c pada sel 3T3-L1 tanpa menimbulkan efek sitotoksik.

Aktivasi transkripsi PPAR- γ oleh ekstrak kelor dibuktikan melalui uji *luciferase reporter assay* dengan Sel HEK293 di transfeksi dengan konstruksi DR-1-Luc, yaitu plasmid reporter yang mengandung tiga urutan PPRE di hulu gen luciferase dan diberi perlakuan ekstrak kelor, peningkatan luminesensi menunjukkan aktivasi langsung PPAR- γ pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ sebesar $\pm 2\text{--}3$ kali kontrol (Le *et al.*, 2024). Temuan ini diperkuat oleh Gómez-Martínez *et al.* (2022), yang menunjukkan penurunan kadar glukosa puasa dan HbA1c setelah konsumsi kapsul daun kelor 2400 mg/hari selama 12 minggu pada pasien prediabetes, tanpa efek samping berarti.

Aktivitas antidiabetes daun kelor juga ditunjukkan melalui pendekatan *in silico* terhadap berbagai target protein. Studi *in silico* oleh Bumolo *et al.* (2025) mengevaluasi potensi metabolit sekunder daun kelor seperti lutein dan 4-(α -L-rhamnopyranosiloksi)benzil glukosinolat sebagai inhibitor α -glukosidase. Hasil *docking* menunjukkan afinitas ikatan sangat kuat dengan nilai energi -10,93 dan -10,27 kcal/mol,

bahkan lebih baik dibandingkan obat standar acarbose. Studi oleh Rendi *et al.* (2021) melaporkan bahwa serpentine menunjukkan ikatan kuat terhadap DPP-4 ($-7,90$ kcal/mol), mendekati nilai vildagliptin, menandakan potensi sebagai modulator inkretin. Sementara itu, penelitian oleh Chigurupati *et al.* (2022) lebih menyoroti efek penghambatan enzim α -amilase secara *in vitro* dan *in silico*. Ekstrak etanol daun kelor menunjukkan nilai IC_{50} sebesar $27,54$ mg/mL yang mendekati acarbose ($19,45$ mg/mL). *Molecular docking* menunjukkan bahwa senyawa fenolik seperti rutin, kaempferol-3-O-rutinosida, dan kuersetin-glikosida memiliki skor ikatan yang kuat terhadap α -amilase, dengan afinitas tertinggi mencapai $-9,40$ kcal/mol.

Berdasarkan penelitian Cris *et al.* (2023) menunjukkan prediksi toksisitas *in silico* terhadap beberapa senyawa bioaktif daun kelor, seperti asam elagik, luteolin, isorhamnetin, kaempferol, asam klorogenat, lutein, apigenin, glukomoringin, brasikasterol, stigmasterol, dan ergosterol menunjukkan hasil negatif pada uji Ames (non-mutagenik) serta tidak mengindikasikan potensi hepatotoksitas, sehingga selain berpotensi farmakologis, senyawa-senyawa tersebut juga tergolong aman. Pada penelitian lain, modifikasi turunan flavonoid luteolin 7-glukosida menghasilkan senyawa baru dengan toksisitas sedang (kelas II menurut *Cramer rules*), bebas karsinogen dan mutagen, sehingga lebih aman dibanding senyawa asalnya (Listyani *et al.*, 2024).

B. Diabetes Melitus

1. Definisi Diabetes Melitus

DM merupakan gangguan metabolik kronis yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) akibat ketidakmampuan tubuh untuk memproduksi insulin secara memadai atau ketidakmampuan sel-sel tubuh dalam merespons insulin secara efektif. Insulin adalah hormon yang berperan yang mengatur kadar gula darah dengan membantu glukosa masuk ke dalam sel sebagai sumber energi (IDF, 2025). Hal ini disebabkan oleh gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai insufisiensi fungsi insulin. Hiperglikemia yang berlangsung lama mengganggu proses *mitophagy* (pembersihan mitokondria rusak) sehingga memperburuk kerusakan jaringan, termasuk di ginjal, retina, saraf perifer, dan jantung (Hu *et al.*, 2025). Respons tubuh terhadap ketidakseimbangan produksi insulin akan

menimbulkan gejala khas seperti poliuria, polidipsia, dan penurunan berat badan tanpa sebab yang jelas (Schwinghammer *et al.*, 2023).

Diabetes dapat diklasifikasikan berdasarkan etiologinya sebagai berikut (IDF, 2025) :

1.1 DM Tipe 1. Suatu kondisi autoimun dimana sistem kekebalan tubuh menyerang sel beta pankreas yang menyebabkan defisiensi insulin absolut. Akibat respon autoimun ini membuat penderita diabetes perlu terapi insulin setiap hari untuk mengatur kadar gula darah karena terjadinya kerusakan sel beta pankreas. Gejalanya termasuk rasa haus berlebihan, sering buang air kecil (poliuria), dan penurunan berat badan.

1.2 DM Tipe 2. Jenis diabetes yang paling umum dengan prevalensi global $> 90\%$. Ditandai resistensi insulin dan disfungsi sekresi insulin secara progresif sehingga tidak memadai untuk memenuhi kebutuhan insulin. Kondisi ini berkembang secara perlahan dan sering kali tanpa gejala, sehingga penderita terdiagnosis ketika sudah mengalami komplikasi seperti, nefropati, retinopati, neuropati, kardiovaskuler, dan penyakit ginjal.

1.3 DM Gestasional (GDM). GDM adalah hiperglikemia yang muncul selama kehamilan akibat ketidakmampuan tubuh memproduksi cukup insulin untuk melawan resistensi insulin akibat hormon plasenta. Bayi dari ibu dengan GDM berisiko lebih tinggi mengalami obesitas dan diabetes tipe 2 di masa depan, meskipun kadar glukosa ibu kembali normal setelah melahirkan.

1.4 DM Tipe lainnya. Kategori ini mencakup diabetes yang disebabkan oleh faktor genetik tunggal, penyakit pankreas, gangguan hormonal, obat tertentu, infeksi virus, atau sindrom genetik. Contoh diabetes ini adalah monogenik meliputi MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) dan diabetes neonatal.

2. Terapi Diabetes Melitus

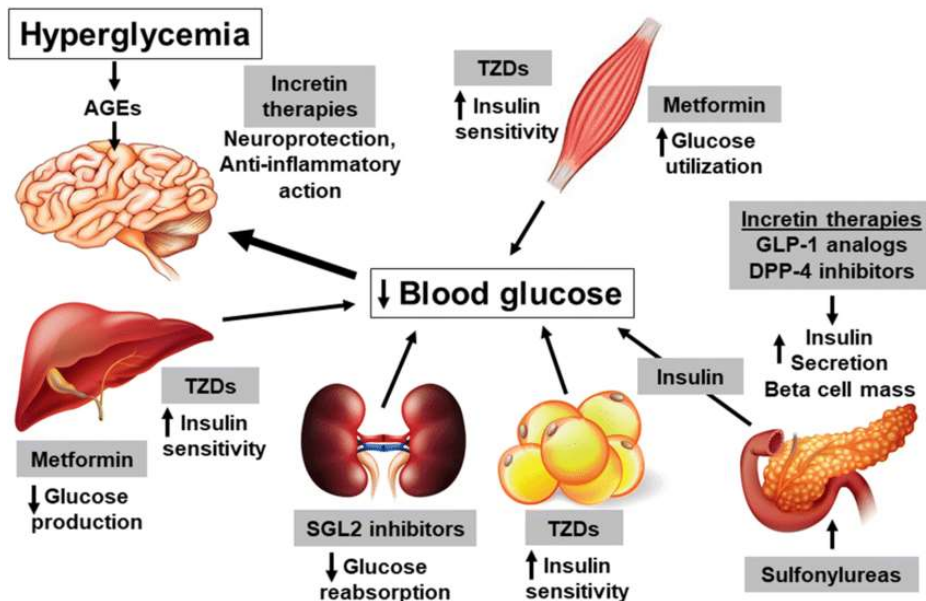
Pengobatan penyakit DM bertujuan untuk mengontrol kadar gula darah agar tetap berada dalam rentang normal dan mencegah komplikasi jangka panjang. Strategi Penatalaksanaan dapat dilakukan dengan intervensi gaya hidup sehat, terapi non-farmakologi seperti aktivitas fisik dan edukasi, serta terapi farmakologis. Terapi farmakologis DM mencakup 2 kelompok utama, yaitu insulin dan obat oral.

Pemilihan terapi tergantung pada kondisi klinis pasien, usia, berat badan, fungsi ginjal, dan risiko hipoglikemia. Masing-masing golongan

memiliki mekanisme kerja yang berbeda yang menargetkan berbagai organ targetnya.

Mekanisme kerja berbagai obat DM berdasarkan organ targetnya tersebut dapat dilihat pada Gambar 7.

Mechanisms of action of antidiabetic drugs



Gambar 7. Mekanisme kerja obat DM (Tyagi & Pugazhenth, 2021)

Metformin bekerja menurunkan kadar glukosa darah dengan meningkatkan penggunaan glukosa di jaringan perifer dan menurunkan produksi glukosa di hati. Sulfonilurea merupakan kelompok obat yang bekerja dengan merangsang sekresi insulin dari sel beta pankreas. Obat ini berisiko menyebabkan hipoglikemia. Sementara, *Thiazolidinediones* (TZD) bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin pada jaringan otot, lemak, dan hati. Hal ini memudahkan pengambilan glukosa oleh jaringan target dan menurunkan resistensi insulin.

Terapi incretin, seperti analog GLP-1 yang resisten terhadap DPP-4 inhibitor, meningkatkan kadar GLP-1 endogen sehingga meningkatkan sekresi insulin dari sel β pankreas. Selain itu, inhibitor SGLT2 menurunkan glukosa darah dengan peningkatan ekskresi glukosa dalam urin dengan mencegah absorpsi glukosa di tubulus ginjal (Tyagi & Pugazhenth, 2021).

C. Protein Target Terapi DM

1. Protein Target *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma* (PPAR- γ)

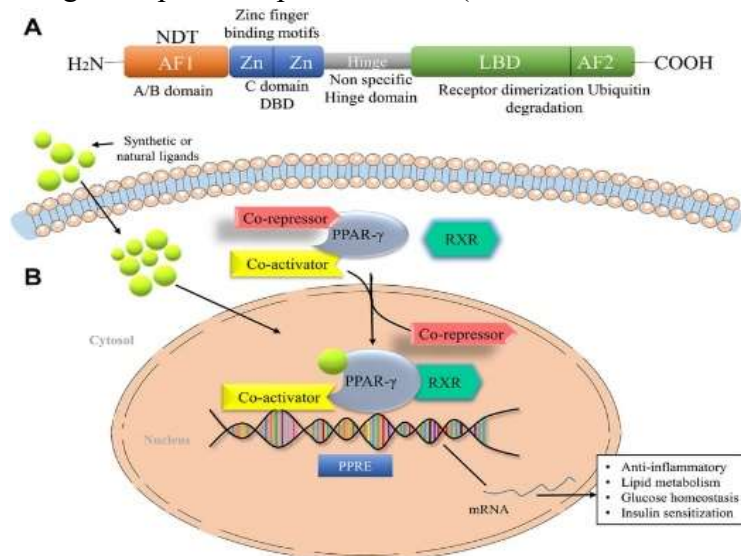
1.1 Mekanisme Protein Target PPAR- γ . *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- γ) termasuk salah satu superfamily reseptor nuklir sebagai faktor transkripsi ligan-teraktivasi. Reseptor ini berperan dalam yang berperan regulasi metabolisme lipid dan glukosa, adipogenesis, dan sensitivitas insulin. Aktivasi PPAR- γ bekerja membentuk heterodimer dengan *retinoid X receptor* (RXR) dengan ikatan ligan. Struktur tiga dimensi PPAR γ terdiri dari domain ikatan DNA dan domain ikatan ligan. TZD adalah ligan PPAR- γ yang paling sering diteliti, termasuk obat rosiglitazone dan pioglitazone (Tyagi *et al.*, 2011).

PPARs memiliki struktur modular serupa dengan domain berbeda secara fungsional. Struktur PPAR- γ terdiri dari lima domain struktural yaitu, AF1 (A/B domain) tempat interaksi dengan coregulator independen ligan, DBD (C domain) domain pengikat DNA dengan motif zinc finger untuk mengenali elemen PPRE, Hinge (D domain) sebagai penghubung fleksibel dengan sinyal lokalisasi nuklir, dan LBD/AF2 (E domain) dimana domain pengikat ligan, tempat aktivasi transkripsi terjadi melalui interaksi dengan koaktivator (Zieleniak *et al.*, 2008).

Aktivasi PPAR- γ dimulai saat ligan lipofilik, baik endogen seperti asam lemak, maupun agonis eksogen seperti *Thiazolidinediones* berikatan dengan domain pengikat ligan (*ligand-binding domain* (LBD)). Proses aktivasi ini membentuk kompleks heterodimer dengan *Retinoid X Receptor α* (RXR α) yang kemudian berikatan secara spesifik dengan elemen DNA yang dikenal sebagai *Peroxisome Proliferator Response Elements* (PPRE) pada promotor gen target (Zieleniak *et al.*, 2008).

Secara umum, tanpa adanya ligan kompleks terikat dengan korepresor yang menghambat transkripsi gen. Setelah ligan berikatan, korepresor dilepaskan dan rekrutmen koaktivator (SRC1, CBP/p300, PGC-1 α) untuk mengaktifkan transkripsi melalui modifikasi kromatin berperan menerjemahkan berbagai protein yang terlibat dalam regulasi metabolisme lipid dan glukosa. Selain regulasi berbasis ligan, aktivitas PPAR- γ juga dipengaruhi oleh modifikasi pasca translasi, seperti fosforilasi pada residu Ser112 oleh jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Modifikasi ini menurunkan aktivitas transkripsi PPAR-

γ yang berperan dalam adipogenesis serta sensitivitas insulin, sehingga menjadi target terapi utama pada diabetes (Zieleniak *et al.*, 2008)



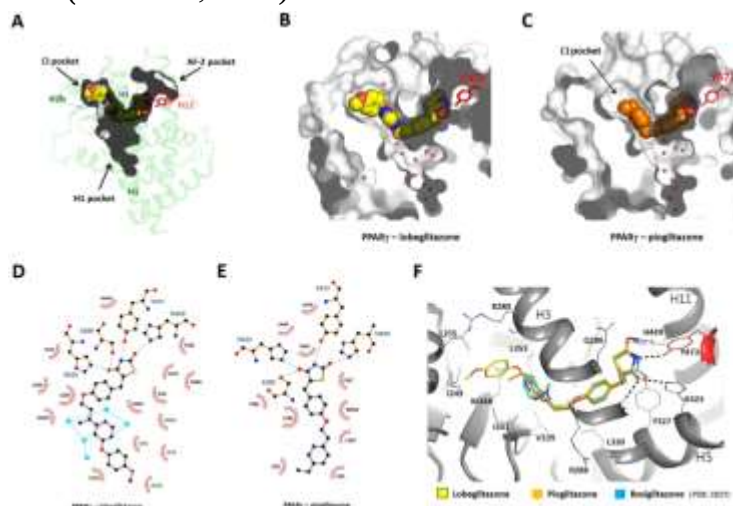
Gambar 8. Mekanisme protein target PPAR- γ
(A) Skema domain struktural PPAR- γ , (B) Mekanisme aktivasi PPAR- γ dengan RXR (Sharma & Patial, 2022)

1.2 Struktur Kristal dan Interaksi PPAR- γ dengan Ligan.

Struktur kristal dari domain pengikatan ligan (LBD) PPAR- γ telah berhasil ditentukan dari Homo Sapiens dalam bentuk kompleks dengan lobeglitazone, salah satu agonis paten dari golongan TZD dengan resolusi tinggi 1.7 Å (PDB ID: 5Y2T). Struktur ini representatif sebagai model penambatan molekuler karena menunjukkan afinitas dan interaksi optimal antara ligan dan residu aktif PPAR- γ . Domain LBD PPAR- γ terdiri atas 13 heliks dan satu β -sheet tiga untai, membentuk kantong pengikatan ligan berbentuk huruf Y dengan volume sekitar 1.300 Å³. Kantong ini terbagi menjadi tiga sub kantong utama, yaitu AF-2 *pocket* (dekat heliks H12), Ω -*pocket*, dan H1-*pocket*. Struktur 5Y2T, lobeglitazone menempati dua sub kantong sekaligus (AF-2 dan Ω -*pocket*) dengan luas kontak ligan-protein sebesar 418 Å² dan mengisi sekitar 44% volume kantong pengikatan, lebih besar dibandingkan pioglitazone maupun rosiglitazone (Lee *et al.*, 2017).

Interaksi antara lobeglitazone dan PPAR- γ terutama terjadi melalui gugus TZD yang membentuk empat ikatan hidrogen dengan residu polar kunci dalam AF-2 *pocket*, yaitu Tyr473 (heliks H12), His323, Ser289, dan His449. Ikatan ini berperan penting dalam menstabilkan konformasi aktif heliks H12, yang dibutuhkan untuk

aktivasi transkripsi gen target PPAR- γ . Selain itu, gugus *p-methoxyphenoxy* yang unik terdapat pada lobeglitazone berinteraksi secara hidrofobik dengan residu-residu di Ω -*pocket* seperti Ile249, Leu255, Ile281, Ile341, dan Met348, sehingga meningkatkan afinitas ligan terhadap protein dengan nilai -8,40 kkal/mol. Dua atom nitrogen pada cincin pirimidinnya juga membentuk ikatan dengan molekul air di sekitar kantong. Kombinasi interaksi polar dan hidrofobik ini menyebabkan lobeglitazone memiliki afinitas hingga 12 kali lebih tinggi dibanding agonis TZD lainnya. Dari sisi kristalografi, struktur 5Y2T menunjukkan occupancy ligand sebesar 96% pada rantai A dan nilai Rfree sebesar 22.3%, yang mencerminkan kualitas data struktur yang sangat baik (Lee *et al.*, 2017).



Gambar 9. Interaksi PPAR- γ dengan ligan

(A). Rongga pengikat ligan PPAR- γ berbentuk Y dengan lobeglitazone (kuning), (B). Lobeglitazone dalam kantong pengikat, terlihat molekul air (merah). (C) Pioglitazone dalam rongga pengikat. (D) Diagram 2D interaksi lobeglitazone-PPAR γ , Ω -*pocket* (hijau), air (biru muda), ikatan H (putus-putus). (E) Diagram interaksi pioglitazone-PPAR γ . (F) Perbandingan posisi lobeglitazone, pioglitazone, dan rosiglitazone; Tyr473 (merah) (Lee *et al.*, 2017)

Perbandingan dengan struktur kristal PPAR- γ yang dikomplekskan dengan pioglitazone menunjukkan bahwa pioglitazone hanya menempati AF-2 *pocket* pada rantai A dan tidak terikat pada rantai B akibat konformasi H12 yang tidak aktif. Luas kontak pioglitazone hanya mencapai 314 Å² dan mengisi sekitar 34% volume kantong, dengan afinitas relatif lebih rendah. Meskipun kedua struktur menunjukkan RMSD sebesar 0.47 Å pada superimposisi rantai A,

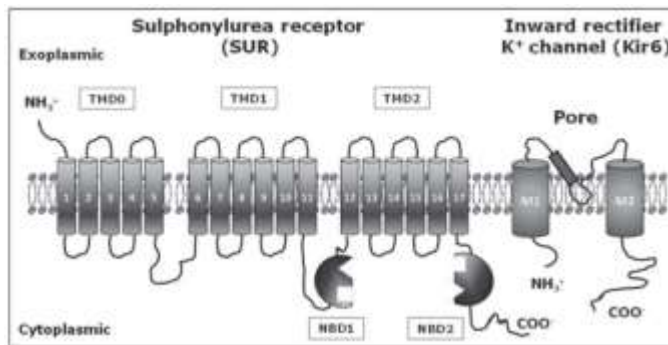
menunjukkan konformasi yang sangat mirip, perbedaan struktur ligan menghasilkan perbedaan besar dalam kekuatan dan stabilitas interaksi (Lee *et al.*, 2017).

Penelitian oleh Surya *et al.* (2024) menunjukkan bahwa senyawa flavonoid seperti kaempferol dari buah mengkudu memiliki afinitas pengikatan yang tinggi terhadap protein PPAR- γ dengan nilai energi bebas Gibbs sebesar -10.70 kcal/mol. Interaksi ini melibatkan residu kunci Cys285 dan Ser342, yang diketahui juga berperan dalam pengikatan ligan sintesis seperti thiazolidinedione. Selaras dengan hasil efek molekuler senyawa alami flavonoid dan asam fenolik terhadap protein PPAR- γ menggunakan pendekatan *in vitro* dan *in silico*. Aktivitas biologis terbukti menurunkan ekspresi gen adipogenik seperti PPAR γ , Lpl, dan Scd1 secara signifikan terhadap sel adiposit 3T3-L1. Senyawa seperti kuersetin, luteolin, apigenin, serta asam fenolik seperti asam elagik dan asam p-kumarat memiliki afinitas ikatan yang signifikan terhadap LBD PPAR- γ . Troglitazone digunakan sebagai ligan pembanding dengan energi pengikatan berkisar antara -4.44 hingga -5.84 kcal/mol. Interaksi ini terutama melibatkan residu penting seperti Phe264, His266, Cys285, Arg288, dan Met348 (Aranaz *et al.*, 2019).

2. Protein Target Sulfonilurea

2.1 Mekanisme Protein Target Sulfonilurea. Target utama salah satu obat oral diabetes sulfonilurea dalam merangsang sekresi insulin adalah saluran KATP (*ATP-sensitive potassium channel*) pada membran sel β pankreas. Sulfonilurea bekerja dengan menutup saluran KATP di membran sel β pankreas melalui ikatan dengan subunit reseptor sulfonilurea (SUR1), sehingga memicu depolarisasi membran. Hal ini memicu terbukanya saluran kalsium (Ca^{2+}) yang mengakibatkan masuknya Ca^{2+} sehingga meningkatkan konsentrasi kalsium di dalam tubuh untuk merangsang pelepasan insulin ke aliran darah. Peran PIP_2 (fosfolipid membran) dan nukleotida seperti MgADP mempengaruhi efektivitas penghambatan oleh sulfonilurea (Proks *et al.*, 2002).

Reseptor sulfonilurea adalah anggota keluarga protein ATP-binding cassette (ABC) sebagai modulator saluran ion KATP bukan sebagai transporter. Saluran KATP adalah hetero octamer yang terdiri dari empat subunit Kir6.x yang membentuk pori kalium dan tiga subunit SUR (Burke *et al.*, 2008). Tiga isoform utama SUR, yaitu SUR1 yang berasosiasi di pankreas dan otak, SUR2A di jantung dan otot rangka, dan SUR2B di otak dan otot polos (Proks *et al.*, 2002).

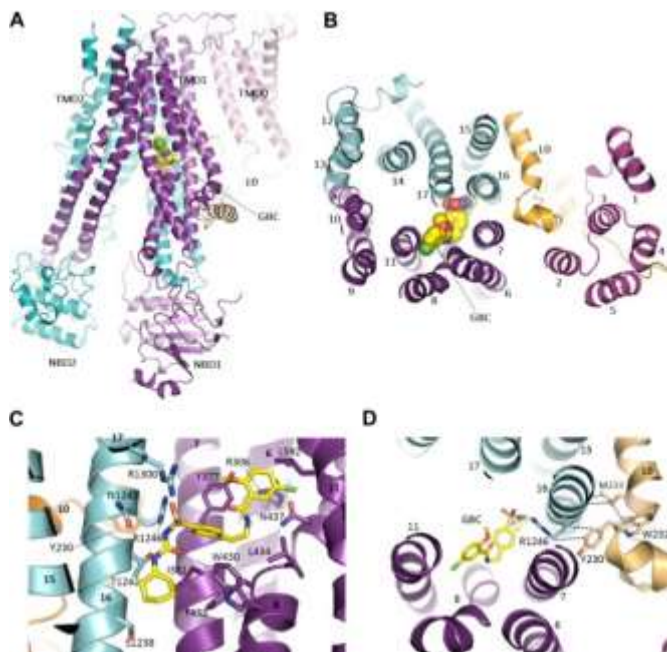


Gambar 10. Struktur transmembran SUR1 (Rubaiy, 2016)

Obat golongan sulfonilurea berikatan kuat dengan SUR yang memiliki afinitas tinggi terhadap glibenklamid ($K_i \sim 10\text{nM}$), menyebabkan penutupan kanal K⁺ dan merangsang sekresi insulin. Interaksi dengan Kir6. memiliki afinitas jauh lebih rendah sehingga tidak cukup untuk efek terapi (Rubaiy, 2016). SUR terdiri dari beberapa domain struktural khas protein ABC, yaitu dua domain transmembran utama (TMD1 dan TMD2) yang terdiri dari enam heliks membran dan dua domain pengikat nukleotida (NBD1 dan NBD2) terletak di sitoplasmik (Burke *et al.*, 2008)

2.2 Struktur Kristal dan Interaksi SUR1 dengan Ligan.

Struktur 3D protein SUR1 sebagai bagian dari kompleks KATP telah berhasil ditentukan menggunakan metode Cryo-EM dengan resolusi tinggi 3.63 Å (PDB ID: 6BAA). Kompleks ini terdiri atas empat subunit Kir6.2 dan empat subunit SUR1, membentuk saluran ion yang sensitif terhadap ATP. Dalam struktur ini, glibenklamid (GBC) yang merupakan *native ligand* dan termasuk dalam golongan obat sulfonilurea, terlihat berikatan spesifik pada kantong pengikatan dalam domain transmembran SUR1, tepatnya pada chain A. Glibenklamid mengikat kuat pada kantong pengikatan di dalam domain transmembran SUR1, yang tersusun oleh heliks dari TMD1 dan TMD2 (Martin *et al.*, 2017).



Gambar 11. Interaksi SUR1 dengan ligan

(A) Diagram pita SUR1 dengan GBC berikatan pada heliks dalam TMD1 dan TMD2, (B). L0 berdekatan dan berinteraksi dengan heliks ABC core. (C) Kantong pengikatan GBC dibentuk oleh residu yang kontak langsung dan diuji lewat mutasi. (D) Y230 dan W232 membantu menstabilkan interaksi GBC secara tidak langsung (Martin *et al.*, 2017).

Residu-residu kunci yang berinteraksi langsung dengan GBC meliputi Ser1238, Thr1242, Asn1245, Arg1246, dan Arg1300. Residu ini membentuk kombinasi interaksi hidrogen, π - π *stacking*, serta interaksi hidrofobik dengan gugus urea dan sulfonilurea dari GBC yang menghasilkan afinitas pengikatan yang sangat tinggi. gugus sulfonil glibenklamid berikatan dengan Arg1246 dan Arg1300, sedangkan cincin aromatiknya distabilkan oleh tumpukan π dengan Tyr377. Gugus cyclohexyl-nya juga terletak sangat dekat dengan S1238, yang secara struktural kritis untuk selektivitas ligan ini terhadap SUR1. Secara keseluruhan, SUR1 memiliki struktur domain khas transporter ABC yang terdiri dari domain transmembran TMD0, loop intraseluler L0, serta dua domain transmembran (TMD1 dan TMD2) dan dua domain pengikat nukleotida (NBD1 dan NBD2) yang membentuk ABC core (Martin *et al.*, 2017).

Studi *in silico* oleh Akintemi *et al.* (2024) mengevaluasi potensi 15 senyawa flavonol aglikon sebagai inhibitor protein SUR1, yang berperan penting dalam regulasi sekresi insulin pada sel β pankreas.

Hasil *docking* menunjukkan bahwa senyawa kaempferol, kuersetin, kaempferid, fisetin, galagin, dan 3-hidroksiflavon. memiliki afinitas pengikatan yang paling tinggi terhadap situs aktif SUR1, dengan nilai energi pengikatan (ΔG_{dock}) berkisar antara -6.19 hingga -5.89 kcal/mol dengan nilai mendekati ligan asli glibenklamid (-6.76 kcal/mol). Semua ligan distabilkan oleh interaksi ikatan hidrogen dengan residu asam amino Asn426, Trp430, Ile423, Gln427, Arg598, Lys602, Ser595, Ser599, Leu434 dan Ala422 di sekitar situs aktif. myricetin dan kaempferid menghasilkan plot RMSD yang sedikit lebih rendah dari GBC yang menunjukkan bahwa mereka menstabilkan enzim lebih dari GBC.

D. *Molecular Docking* (Penambatan Molekuler)

Molecular docking merupakan salah satu pendekatan komputasi penting untuk digunakan dalam perancangan obat secara rasional. Metode ini yang bertujuan untuk memperkirakan berbagai konformasi terbaik dari ligan saat berikatan dengan reseptor serta interaksi molekuler yang mungkin terjadi dalam kondisi fisiologi dan afinitas pengikatan. *Molecular docking* dapat dibedakan menjadi 3 berdasarkan fleksibilitas molekul, yaitu rigid (kaku), semi- fleksibel (sebagian fleksibel), dan fleksibel (fleksibel penuh). Studi *docking* telah menjadi alat yang berguna untuk menyaring dan memilih senyawa yang paling potensial sebagai kandidat obat bahkan sebelum proses sintesis kimia berlangsung di laboratorium. *Molecular docking* memungkinkan prediksi afinitas ikatan ligan terhadap situs aktif protein dengan menggunakan fungsi skoring berbasis energi, di mana nilai energi yang lebih rendah mengindikasikan stabilitas interaksi yang lebih tinggi (Singh *et al.*, 2021).

Studi *molecular docking* dapat dilakukan antara protein-protein, protein-ligan dan protein-nukleotida. Keberhasilan suatu program *docking* ditentukan dari dua komponen yaitu fungsi *scoring* dan algoritma. Pada desain obat, proses ini memprediksi cara pengikatan ligan yang telah diketahui sebelumnya untuk menemukan ligan baru yang memiliki afinitas tinggi sebagai alat prediksi afinitas pengikatan. Fungsi *scoring* yang optimal harus memberi nilai tertinggi diantara semua konformasi yang dihasilkan dan algoritma yang sempurna harus mampu menghasilkan pola pengikatan melalui eksperimen (Tripathi & Misra, 2017).

1. Fungsi *Scoring*

Fungsi *scoring* merupakan komponen penting dalam konteks *molecular docking*. Fungsi ini digunakan dalam penentuan pose atau konfigurasi pengikatan molekul ligan terhadap protein target. Tiga kemampuan berikut untuk memiliki fungsi *scoring* yang seimbang. Pertama, menilai dan memeringkat pose ligan terbaik secara cepat dan akurat yang dihasilkan dalam simulasi *docking*. Kedua, harus mampu menyaring dan mendeteksi senyawa yang potensial dalam pustaka molekul besar. Ketiga, membedakan pengikatan yang kuat antara molekul kecil dan reseptor asli dibanding off-target (Zheng, 2022).

1.1 Perhitungan *Scoring*. Salah satu output utama dari proses *molecular docking* adalah nilai energi pengikatan (*binding energy*) yang digunakan sebagai indikator afinitas interaksi antara ligan dan target protein. Energi pengikatan yang dihasilkan (ΔG_{bind}) dihitung dalam bentuk kombinasi energi yang berbeda seperti ikatan H, torsi bebas, elektrostatik, desolasi sistem tak terikat, total internal, dispersi, dan tolakan, dll. Konstanta disosiasi (KD) digunakan untuk menandakan energi pengikatan dalam bentuk energi bebas *Gibbs* (ΔG) (Azad, 2022).

Fungsi penilaian umum dari *binding energy* ditulis sebagai berikut :

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{H-bond} + \Delta G_{electrostatic} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Fungsi penilaian estimasi dengan algoritma AutoDock Vina ditulis sebagai berikut :

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{H-bond} + \Delta G_{electrostatic} + \Delta G_{desolvation}$$

AutoDock Vina menggunakan formula sederhana yang hanya mencakup energi van der Waals, ikatan hidrogen, elektrostatik, dan desolvasi. Nilai energi pengikatan yang lebih negatif menunjukkan afinitas yang lebih kuat dan stabil dalam kompleks antara ligan dan protein (Azad, 2022).

2. Algoritma

Algoritma adalah metode komputasi yang digunakan dalam simulasi *docking* untuk mengoptimalkan dan memprediksi kompleks ligan dan reseptor, guna memperoleh posisi ligan terbaik berdasarkan energi interaksi terendah dan kesesuaian geometri dalam situs pengikatan. Aplikasi *docking* dapat diklasifikasikan berdasarkan algoritma pencariannya, seperti *Incremental Construction* (IC), *Genetic Algorithm* (GA), *Monte Carlo* (MC), dll (Dias & de Azevedo., 2008). Algoritma *molecular docking* hanya memperhatikan faktor translasi dan

orientasi (derajat kebebasan) dengan mempergunakan ligan dan protein (Agus *et al.*, 2023).

3. Interaksi Ikatan Protein Ligan

Ikatan antara protein dan ligan adalah cara molekul kecil terhubung dengan sasaran biologisnya, biasanya protein. Interaksi ini sangat penting dalam banyak proses biokimia, seperti mengaktifkan enzim, menghambat reseptor, atau mengatur fungsi biologis lainnya. Ini memprediksi afinitas pengikatan ligan untuk membentuk kompleks yang stabil dengan protein dengan menemukan orientasi yang disukai dari minimum *free binding energy* (Tripathi & Misra, 2017). Interaksi ini melibatkan berbagai jenis interaksi yang meliputi :

3.1 Ikatan Hidrogen. Ikatan hidrogen adalah interaksi elektrostatis yang terjadi antara pasangan elektron bebas yang dimiliki oleh atom-atom elektronegatif (seperti atom N,O,S) bertindak sebagai donor elektron dengan atom hidrogen (H) dari gugus -OH, -NH atau -SH. Ikatan ini berperan penting dalam menstabilkan struktur molekul, seperti pada α -heliks protein dan pasangan basa DNA (Agus *et al.*, 2023).

3.2 Ikatan Ionik. Interaksi ini terbentuk antara ion bermuatan berlawanan melalui gaya tarik elektrostatis yang sangat kuat. Interaksi antara gugus karboksilat (-COOH) bermuatan negatif dan amonium (NH_4^+) bermuatan positif, seperti pada asam amino basa (arginin, lisin, histidin) dan asam (glutamat, aspartat) (Agus *et al.*, 2023).

3.3 Interaksi Hidrofobik. Gugus hidrofobik membuat molekul air berorientasi dalam kondisi berenergi tinggi. Ketika dua gugus hidrofobik berdekatan, air yang terperangkap di antaranya dilepaskan, sehingga energi sistem menurun. Interaksi ini menghasilkan 0,7 kkal/mol per interaksi $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ (Agus *et al.*, 2023).

3.4 Interaksi Van Der Waals. Ikatan ini dapat terbentuk pada semua atom, dengan adanya gaya tarik antar molekul atau atom netral yang muncul akibat pergeseran awan elektron yang dipengaruhi oleh inti atom tetangga (polarisabilitas). Dalam interaksi ligan-reseptor, gaya Van der Waals berperan saat cincin benzena dan rantai hidrokarbon berikatan dengan permukaan reseptor (Agus *et al.*, 2023).

3.5 Interaksi π - π Stacking. Interaksi π - π merupakan gaya non-kovalen antara dua sistem aromatik melalui tumpang tindih orbital π , baik secara sejajar (*face-to-face*) maupun tegak lurus (*edge-to-face*) untuk memaksimalkan interaksi antara daerah kaya elektron dan daerah yang kekurangan elektron pada kuadropol cincin aromatik. Interaksi π - π

ini sangat penting dalam menstabilkan banyak sistem kokristal yang di dalamnya terdapat cincin aromatik (Berry & Steed, 2017).

3.6 Interaksi π -Kation. Interaksi π -kation adalah interaksi non-kovalen antara ligan aromatik netral (π -system) dengan residu asam amino kation (Arg, Lys, His atau gugus NH_3^+ ligan). Studi komputasi menunjukkan bahwa interaksi π -kation dengan Arg lebih umum dan stabil karena kombinasi gaya elektrostatis dan dispersi yang stabil dalam medium polar seperti air (Kumar *et al.*, 2018).

3.7 Interaksi π -Anion. Interaksi π -anion merupakan interaksi non-kovalen antara cincin aromatik yang bersifat elektropositif dengan ion negatif (anion, seperti SO_4^{2-} , residu protein seperti His, Tyr, Phe). Interaksi dapat terjadi dengan sinergi bersama interaksi π - π atau π -kation (*triad*) dalam protein, mempengaruhi pelepasan, pengikatan ligan, dan bergantung pada keberadaan molekul air sebagai penstabil (Balamurugan & Pisabarro, 2021).

3.8 Interaksi π -Alkil. Interaksi π -alkil terjadi antara sistem π aromatik dan gugus alkil non-polar. Biasanya terjadi jika pusat dari cincin kebakaran (π ring centroid) dan gugus alkil berada dalam jarak $\leq 5.5 \text{ \AA}$ memiliki setidaknya satu pasang atom dalam batas atom terdekat π - π (Gómez-Jeria *et al.*, 2020).

3.9 Interaksi Amide- π Stacking. Interaksi ini adalah interaksi non-kovalen yang terjadi antara gugus amida ($-\text{CONH}-$) dan sistem aromatik π , seperti cincin benzena atau heteroaromatik yang dapat terjadi jika keduanya berjarak $\leq 6 \text{ \AA}$ dan memiliki tumpang tindih spasial yang mendukung. Interaksi ini bersifat arah dan spesifik, serta memiliki kontribusi terhadap pengenalan molekul biologis dan stabilitas struktur makromolekul seperti protein, DNA, dan kompleks protein-ligan (Gómez-Jeria *et al.*, 2020).

3.10 Ikatan Halogen. Ikatan halogen adalah interaksi non-kovalen yang terjadi antara atom halogen seperti (Cl, Br, atau I) yang terikat secara kovalen dan memiliki kekosongan elektron (σ -hole) dengan pasangan elektron bebas pada akseptor seperti nitrogen dalam cincin piridin. Interaksi ini bersifat tertutup dan penting dalam desain kristal supramolekular, termasuk dalam sistem *cocrystal* obat (Berry & Steed, 2017).

3.11 Interaksi Elektrostatis. Interaksi elektrostatis merupakan interaksi spesifik antara residu-residu bermuatan yang berperan penting dalam pelipatan protein, stabilitas struktur, fleksibilitas, serta pengikatan

ligan. Salah satu bentuk utamanya adalah salt bridge, yaitu ikatan antara residu bermuatan positif (Arg, Lys, His) dan negatif (Asp, Glu) yang berjarak kurang dari 4 Å. Interaksi ini membantu menjaga orientasi ligan dalam situs aktif dan menstabilkan kompleks protein–ligan (Gómez-Jeria *et al.*, 2020).

4. Validasi *Molecular Docking*

Validasi *docking* merupakan langkah krusial awal yang umum digunakan dalam proses *molecular docking* yang dilakukan melalui *re-docking*. Metode ini *mendocking* ulang ligan asli (*native ligand*) ke dalam protein target yang sama dari struktur kristal kompleks protein–ligan. Proses ini berfungsi untuk penyusunan parameter *grid box* yang tepat, mengevaluasi kapasitas metode *docking* dalam mereproduksi pose pengikatan kristalografi, dan memperoleh estimasi energi ikatan yang dapat digunakan untuk menyusun urutan afinitas senyawa. Keberhasilan validasi ditentukan melalui analisis RMSD dengan nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ Å}$ menunjukkan bahwa metode *docking* dapat mereproduksi pose asli ligan, sehingga parameter tersebut dapat diterapkan untuk molekul uji (de Oliveira *et al.*, 2022).

Native ligand adalah senyawa yang secara eksperimental telah diketahui berikatan dengan protein target dan tersedia dalam struktur kristal PDB. Prinsip penentuan *grid box* menjadi area 3D yang membatasi ruang pencarian ligan pada situs aktif protein selama proses *docking*. *Grid box* meliputi search box center dan search box size yang dapat ditentukan secara manual di sekitar situs aktif protein menggunakan koordinat (x,y,z). Parameter *sampling exhaustivity* dapat disesuaikan dalam rentang 1 hingga 64 untuk meningkatkan akurasi prediksi posisi ligan dalam situs aktif. Seluruh proses persiapan ligan dan target, serta visualisasi hasil *docking*, dilakukan melalui antarmuka SwissDock yang terintegrasi dengan *Swiss Drug Design tools* lainnya (Bugnon *et al.*, 2024).

5. *Drug-Likeness*

Drug-likeness atau kemiripan obat merupakan konsep penting pada penemuan dan pengembangan obat modern dalam desain obat berbasis struktur (*structure-based drug design*) yang menilai kemungkinan suatu molekul untuk menjadi obat oral berkenaan dengan bioavailabilitas yang baik, stabilitas, dan interaksi optimal dengan target biologis. Gagasan ini secara teratur diterapkan untuk melakukan penyaringan pustaka kimia guna mengeliminasi molekul yang memiliki

karakteristik yang kemungkinan besar tidak cocok dengan profil farmakokinetik yang diinginkan. Parameter *drug-likeness* mencakup berbagai kriteria yang berhubungan dengan farmakokinetika, seperti kelarutan, permeabilitas membran, bioavailabilitas, metabolisme, dan toksisitas. (Lipinski *et al.*, 1997).

Sejumlah aturan telah dikembangkan untuk menilai *drug-likeness*, seperti yang dikemukakan oleh Lipinski, Veber, Ghose, Egan, dan Muegge. Dari berbagai pendekatan tersebut, aturan Lipinski paling umum digunakan karena dinilai efektif dalam mengevaluasi senyawa yang dikenal memiliki penyerapan oral yang baik serta karena kesederhanaannya dan efektivitasnya dalam mengidentifikasi senyawa dengan karakteristik farmakokinetik yang menguntungkan (Jia *et al.*, 2020).

Aturan *Lipinski's Rule of Five* (Ro5) mencakup: (a) berat molekul ≤ 500 , (b) LogP (koefisien partisi oktanol/air) ≤ 5 (atau MlogP $\leq 4,15$), (c) jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , dan (d) jumlah akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 . Menurut aturan Lipinski's Rule of Five suatu senyawa dikategorikan memenuhi kelayakan *drug-likeness* jika melanggar satu dari empat parameter utama yang ditetapkan sehingga masih dianggap berpotensi sebagai obat oral (Lipinski *et al.*, 1997).

6. Prediksi Toksisitas

Toksisitas adalah kemampuan suatu zat untuk menimbulkan cedera pada organisme hidup, sedangkan bahaya merupakan kemungkinan terjadinya cedera tersebut pada jumlah dan cara penggunaan tertentu (Cramer *et al.*, 1978). Penilaian toksisitas bertujuan untuk mengidentifikasi potensi risiko kesehatan, menetapkan prioritas pengujian, dan merencanakan strategi pengendalian paparan (Benigni *et al.*, 2008). *Decision tree* yang terdiri atas 33 pertanyaan telah dikembangkan oleh Cramer *et al.* (1978) untuk mengklasifikasikan senyawa organik atau *metallo*-organik terdefinisi secara struktural ke dalam tiga kelas, yaitu kelas I (toksisitas rendah), kelas II (toksisitas sedang), dan kelas III (toksisitas tinggi). Klasifikasi ini didasarkan pada hubungan struktur–aktivitas, data metabolisme, serta informasi toksisitas sebagai perkiraan awal risiko bila diberikan secara oral.

Karsinogenisitas dan mutagenisitas merupakan dua titik akhir toksisitas yang menimbulkan kekhawatiran tertinggi bagi kesehatan manusia. Zat mutagen dapat merusak gen pada sel gamet dan diwariskan. Pengujian toksisitas karsinogen mengidentifikasi senyawa uji penyebab

kanker atau tumor. Potensi karsinogenisitas dan mutagenisitas senyawa dapat diprediksi melalui *rulebase Benigni/Bossa* berdasarkan *structural alerts* (SA) sebagai gugus fungsi atau sub struktur molekul yang diketahui berhubungan dengan aktivitas karsinogenik yang dibedakan menjadi genotoksik dan non-genotoksik (Benigni & Bossa, 2008). Mutagenisitas dapat dideteksi menggunakan *strain* bakteri *Salmonella typhimurium* atau *Escherichia coli* melalui uji Ames untuk mendeteksi agen penginduksi mutasi genotoksik. Metode ini efektif dalam memprediksi karsinogenisitas senyawa DNA-reaktif, namun tidak dapat mendeteksi karsinogen non-genotoksik. Sensitivitas deteksi dapat ditingkatkan melalui pendekatan terintegrasi yang menggabungkan *structural alerts*, uji Ames, dan *cell transformation assay* (Benigni *et al.*, 2013).

E. Database

1. PubChem

PubChem adalah basis data kimia besar yang dikelola oleh NCBI, terdiri dari tiga basis data: Substance, Compound, dan BioAssay. Basis data Compound menyimpan struktur kimia dari Substance, sedangkan BioAssay berisi hasil percobaan biologis. Dalam pembaharuan, PubChem mengalami kemajuan dengan tambahan data baru tentang spektroskopi, bioaktivitas, dan informasi terkait pangan serta pertanian. Antarmuka baru seperti Target View, Bioactivity Dyad, dan Patent View memudahkan eksplorasi senyawa dan target biologis. Fitur PUG-View juga mendukung integrasi data untuk penelitian, menjadikan PubChem sumber yang penting bagi penelitian biomedis dan pengembangan obat. (Kim *et al.*, 2019).

2. Protein Data Bank (PDB)

Protein Data Bank (PDB) merupakan pusat data struktur 3D biomolekul yang didirikan pada tahun 1971. PDB memberikan akses terbuka kepada jutaan pengguna data di seluruh dunia untuk lebih dari 175.000 struktur protein dan asam nukleat (DNA, RNA) yang telah ditentukan melalui eksperimen, serta interaksi mereka satu sama lain dan dengan ligan kecil. PDB memainkan peran penting dalam pengembangan pendekatan struktur-guided drug discovery, termasuk studi *molecular docking* dan algoritma prediksi seperti Alpha Fold, yang dapat memperkirakan struktur protein dengan akurasi tinggi. Memiliki struktur protein yang dapat divalidasi memungkinkan analisis interaksi

ligan-protein yang lebih akurat. Target obat telah diidentifikasi dengan data PDB, molekul kecil dengan afinitas tinggi telah dibuat, dan proses perancangan obat telah ditingkatkan dengan kecerdasan buatan (Burley & Berman, 2021).

3. KnapSack

KnapSack adalah sebuah basis data bioinformatika spesies yang dirancang untuk menjelaskan hubungan antara tanaman dan metabolit sekunder. Situs web KnapSack menyediakan penelusuran senyawa berdasarkan rumus kimia, nama metabolit atau spektrum massa, dan massa molekul. Selain itu, mengintegrasikan data kegunaan tanaman berupa aktivitas biologis, penggunaan geografis, mekanisme, resep obat tradisional Jepang (Kampo) serta berisi database yang menghubungkan data eksperimen dengan informasi senyawa (Afendi *et al.*, 2012).

F. Pemrograman *Molecular docking*

1. SwissDock

SwissDock adalah layanan berbasis web untuk *docking* protein-ligan yang pertama kali rilis pada tahun 2011 sebagai bagian dari proyek *Swiss Drug Design* dan awalnya menggunakan algoritma EADock DSS. Versi yang diperbarui, SwissDock 2024 membawa peningkatan signifikan dengan menyediakan dua pilihan algoritma *docking*. Setiap fitur yang disediakan tidak hanya berfungsi secara teknis, tetapi juga didasarkan pada prinsip ilmiah yang solid dalam kimia komputasi dan bioinformatika. Fitur-fitur utama dalam *web server* SwissDock 2024 sebagai berikut:

1.1 Dua Algoritma *Docking*

1.1.1 *Attracting Cavities* (AC). *Attracting Cavities* 2.0 berfungsi dengan menempatkan tiga jenis titik di rongga protein, yaitu *attracting* (menarik ligan), *placement* (tempat awal ligan ditempatkan), dan *electrostatic* (interaksi elektrostatik). Algoritma ini bekerja dengan membangun titik *attracting cloud* di dalam kantong aktif protein, kemudian “mencetak” ligan ke dalamnya melalui rotasi dan optimasi geometris, sebelum akhirnya menyisipkan ulang protein target untuk evaluasi energi ikatan. Kemudian, dipandu oleh parameter prioritas rongga untuk menentukan ke dalam rongga target dengan nilai 70 (buried), 60 (medium), 50 (shallow). Parameter *exhaustivity* menyesuaikan kelancaran rotasi, menghasilkan lebih banyak pose.

Untuk ligan kovalen, sistem mendukung evaluasi berdasarkan topologi pasca-reaksi (Bugnon *et al.*, 2024).

1.1.2 AutoDock Vina. AutoDock Vina menawarkan metode yang menggabungkan kecepatan dan akurasi menggunakan penilaian berbasis grid dalam prediksi interaksi ligan-protein. Prinsip nya mengeksplorasi ruang 3D yang disebut *search space* (kotak grid) dengan mengevaluasi berbagai posisi, orientasi dan konformasi ligan terhadap protein. Setelah menemukan area dengan skor afinitas terbaik dilakukan penyempurnaan pose ligan di posisi tersebut (Bugnon *et al.*, 2024).

1.2 Input Ligan. Input ligan dalam *docking* dilakukan dengan preparasi ligan yang berfungsi untuk menghasilkan representasi molekul kecil yang secara kimia dan konformasi valid agar dapat disimulasikan berinteraksi dengan target. SwissDock mendukung berbagai format input ligan untuk menyediakan struktur molekul yang dapat dikenali oleh algoritma *docking*, yaitu SMILES, Mol2, PDBQT, *molecular sketcher*. Preparasi otomatis ligan termasuk protonasi, penambahan atom hidrogen memudahkan dalam validasi dan penambatan *docking* (Bugnon *et al.*, 2024).

1.3 Input Target. SwissDock mendukung input target diunggah sebagai PDB atau PDBQT, atau diambil langsung dari database PDBe, Alpha Fold, atau SWISS-MODEL. Input target digunakan sebagai optimasi struktur dan penentuan *cavity* dan memungkinkan simulasi interaksi molekul kecil dan adanya preparasi otomatis untuk protein target (Bugnon *et al.*, 2024).

1.4 Ruang Pencarian (*Search Box*). Penentuan *grid box* menjadi area 3D yang membatasi ruang pencarian ligan pada situs aktif protein selama proses *docking*. *Grid box* meliputi *search box center* untuk menentukan titik tengah *grid box* dan *search box size* untuk menentukan dimensi box yang dapat ditentukan secara manual di sekitar situs aktif protein menggunakan koordinat (x,y,z). SwissDock memungkinkan penyesuaian wilayah pencarian (*search box*) secara visual melalui tampilan 3D (Bugnon *et al.*, 2024).

Studi Venkataraman *et al.* (2022) menggunakan struktur PDB 5Y2T dengan ligan asli Lobeglitzone. Koordinat *grid box* ditentukan berdasarkan residu-residu aktif yang terlibat dalam pengikatan ligan. *Grid box* ditetapkan sebesar $22 \times 24 \times 26$ Å di sumbu x,y,z untuk mencakup interaksi penting dengan residu Ser289, His323, Tyr473, dan Cys285. Strategi ini memperkuat validitas protokol *docking* sebelum

diaplikasikan pada senyawa uji lainnya. Penentuan *grid box* dilakukan menggunakan *AutoDock Tools* dengan memusatkan grid pada posisi ligan asli (*native ligand*) yang terikat pada protein target.

1.5 Parameter *Sampling Exhaustivity*. SwissDock menyediakan algoritma AutoDock Vina yang terdapat fitur parameter *sampling exhaustivity* untuk melakukan validasi dan penambatan *docking*. *Sampling exhaustivity* adalah parameter yang memprediksi dan mengontrol seberapa intensif pencarian untuk mode pengikatan terbaik antara ligan dan protein. Peningkatan nilai *exhaustiveness* dapat meningkatkan akurasi prediksi mode pengikatan, namun harus diseimbangkan dengan waktu komputasi (Jaghooori *et al.*, 2016). Nilai *exhaustivity* default dalam AutoDock Vina adalah 8. Untuk akurasi yang lebih baik, nilai default kelengkapan diubah dan ditetapkan menjadi sekitar 24 (Azad, 2022).

1.6 Scoring SwissDock Algoritma *Autodock Vina*. SwissDock menggunakan vina scoring function menghitung afinitas ikatan berdasarkan interaksi molekul 3D, termasuk interaksi van der Waals, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ionik, dan interaksi π -kation serta π - π *stacking*. Hasilnya berupa nilai energi bebas ikatan (ΔG) dalam satuan kcal/mol, di mana semakin negatif nilainya, maka semakin kuat afinitas antara ligan dan protein (Bugnon *et al.*, 2024).

2. PyMOL

PyMOL merupakan perangkat lunak visualisasi molekul biomolekuler open-source yang dapat menghasilkan gambar 3D dalam berbagai studi struktur dan desain obat berbasis komputasi. Salah satu kemampuan penting PyMOL dalam konteks validasi *docking* adalah melakukan superimposisi dan perhitungan nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) antara pose hasil *docking* dengan struktur referensi kristal, yang menjadi indikator keakuratan prediksi interaksi ligan-protein. Validitas pose dinilai berdasarkan seberapa besar nilai RMSD yang dimana nilai nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ yang mengindikasikan bahwa hasil *docking* dianggap valid secara struktural (Lill & Danielson, 2011).

3. Ligplot+

LigPlot+ merupakan pengembangan dari perangkat lunak LIGPLOT asli dengan antarmuka pengguna grafis (GUI) baru. Program ini memungkinkan representasi 2D dari beberapa kompleks ligan dengan protein secara sederhana dan otomatis, tanpa perlu penyelarasan awal komponen struktur protein atau menggunakan penampil 3D. Perangkat

ini dirancang untuk menyajikan visualisasi interaksi penting seperti menampilkan ikatan hidrogen sebagai garis putus-putus dan kontak hidrofobik sebagai busur berbentuk jari-jari. Representasi tersebut sangat membantu dalam memahami pola interaksi ligan dengan residu aktif pada protein target (Laskowski & Swindells, 2011).

LigPlot+ memiliki sejumlah fitur unggulan, di antaranya kemampuan untuk menganalisis banyak kompleks protein-ligan secara bersamaan, sehingga memungkinkan perbandingan langsung beberapa antar struktur dengan orientasi yang seragam. Selain itu, perangkat ini juga dapat menempatkan residu pada posisi ekuivalen dalam struktur 3D setelah superposisi ditempatkan pada posisi dan orientasi ekuivalen pada plot 2D sehingga mendukung evaluasi afinitas ligan terhadap situs aktif. LigPlot+ kompatibel dengan format .pdb dan terintegrasi dengan visualisasi 3D seperti PyMOL dan RasMol. Kemudahan dan kemudahannya menjadikan alat yang efektif dalam analisis *molecular docking* dan desain obat berbasis struktur (Laskowski & Swindells, 2011).

G. Landasan Teori

DM merupakan penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan hiperglikemia akibat gangguan defisiensi insulin, resistensi insulin, atau kombinasi keduanya (IDF, 2025). Daun kelor dikenal sebagai tanaman “pohon ajaib” karena mengandung beragam senyawa bioaktif seperti flavonoid, asam fenolik, glukosinolat tiokarbamat, dan triterpenoid. Senyawa – senyawa bioaktif ini telah banyak diteliti karena aktivitas farmakologinya, termasuk sebagai agen antidiabetes. Salah satu mekanisme potensial dari aktivitas tersebut adalah melalui modulasi protein target terapi DM, seperti PPAR- γ dan reseptor sulfonilurea (SUR1). Kandungan flavonoid dalam daun kelor diduga bekerja melalui mekanisme mirip sulfonilurea yaitu meningkatkan sekresi insulin dari sel beta pankreas melalui penutupan kanal K^+ (Toby *et al.*, 2020).

Senyawa astragalin yang diisolasi dari daun kelor terbukti meningkatkan sekresi adiponektin pada sel 3T3-L1 yakni, hormon adiposit yang memiliki efek meningkatkan sensitivitas insulin dan memediasi aktivasi jalur PPAR- γ . Aktivasi PPAR- γ ini penting karena berkontribusi terhadap regulasi ekspresi gen-gen yang terlibat dalam transpor glukosa dan metabolisme lipid, sehingga memainkan peran sentral dalam pengendalian glukosa darah (Swamy *et al.*, 2022). Aktivasi

PPAR- γ juga dikonfirmasi melalui uji *luciferase reporter* berbasis PPRE di sel HEK293A yang menunjukkan bahwa ekstrak secara langsung mengaktifasi PPAR γ dalam cara yang serupa dengan agonis rosiglitazon (Le *et al.*, 2024). Beberapa senyawa bioaktif daun kelor, seperti flavonoid, asam fenolik, glukosinolat (glukomoringin), dan fitosterol, diprediksi aman secara *in silico* (Ames negatif, tanpa indikasi hepatotoksisitas) (Cris *et al.*, 2023). Modifikasi luteolin 7-glukosida menurunkan toksisitas menjadi kelas II serta menghilangkan sifat karsinogen dan mutagen (Listyani *et al.*, 2024).

PPAR- γ merupakan reseptor nuklir yang berperan dalam metabolisme glukosa dan lipid. Aktivasi PPAR- γ bekerja membentuk heterodimer dengan *Retinoid X Receptor* (RXR) dengan ikatan ligan dan mengikat elemen DNA spesifik (PRE) sehingga mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam metabolisme lipid dan glukosa, adipogenesis, dan sensitivitas insulin. Struktur tiga dimensi PPAR γ terdiri dari domain ikatan DNA dan domain ikatan ligan. Tiazolidinedion (TZD) adalah ligan PPAR- γ yang paling sering diteliti (Zieleniak *et al.*, 2008). Struktur kristal domain pengikat ligan PPAR- γ LBD yang telah dikarakterisasi menunjukkan interaksi dengan agonis lobeglitazone yang berinteraksi dengan residu Ser289, His323, His449, Tyr473 yang membantu menstabilkan konformasi di heliks H12 (Lee *et al.*, 2017).

SUR1 adalah subunit regulator dari saluran ion yang terdapat pada sel β -pankreas. SUR1 berperan dalam mengatur sekresi insulin dengan cara mengikat ligan seperti glibenklamid yang menghambat saluran KATP menyebabkan depolarisasi membran yang memicu terbukanya kanal Ca^{2+} . Struktur kristal dari kompleks SUR1 dengan ligan seperti glibenklamid yang menunjukkan interaksi ligan dengan *pocket* pengikat pada bagian transmembran. Residunya meliputi: Ser1238, Thr1242, Asn1245, Phe1321, yang berkontribusi pada ikatan hidrogen dan interaksi π - π dengan ligan (Martin *et al.*, 2017).

Senyawa flavonoid seperti kaempferol, kuersetin, luteolin, apigenin, kaempferid serta asam fenolik seperti asam elagik dan asam p-kumarat memiliki afinitas ikatan yang signifikan terhadap ligand binding domain (LBD) PPAR- γ dan memiliki afinitas pengikatan yang tinggi terhadap situs aktif SUR1 (Akintemi *et al.*, 2024; Surya *et al.*, 2024). Studi ini memperkuat kemungkinan bahwa senyawa alami, termasuk flavonoid dari daun kelor seperti kaempferol dan quercetin, dapat menjadi kandidat alternatif terhadap ligan sintesis seperti lobeglitazone.

Molecular docking merupakan salah satu pendekatan komputasi penting untuk digunakan dalam perancangan obat secara rasional. Metode ini yang bertujuan untuk memperkirakan berbagai konformasi terbaik dari ligan saat berikatan dengan reseptor serta interaksi molekuler yang mungkin terjadi dalam kondisi fisiologi dan afinitas pengikatan. *Molecular docking* memungkinkan prediksi afinitas ikatan ligan terhadap situs aktif protein dengan menggunakan fungsi skoring berbasis energi, di mana nilai energi yang lebih rendah mengindikasikan stabilitas interaksi yang lebih tinggi (Singh *et al.*, 2021).

Drug-likeness atau kemiripan obat adalah konsep penting dalam penemuan dan pengembangan obat modern yang menilai kemungkinan suatu molekul untuk menjadi obat oral berkenaan dengan bioavailabilitas yang baik, stabilitas, dan interaksi optimal dengan target biologis. Salah satu pendekatan yang paling banyak digunakan untuk menilai drug-likeness adalah aturan Lipinski's Rule of Five (Ro5) (Lipinski *et al.*, 2012).

H. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori diatas, dapat disusun hipotesis bahwa:

Pertama, senyawa aktif seperti flavonoid dan asam fenolik yang terkandung dalam daun kelor memiliki prediksi afinitas energi ikatan yang tinggi terhadap protein target PPAR- γ dan SUR1 yang dapat dibandingkan dengan ligan aslinya berdasarkan *molecular docking*.

Kedua, senyawa aktif seperti flavonoid dan asam fenolik yang terkandung dalam daun kelor memiliki pola interaksi yang baik dengan residu asam amino pada situs aktif terhadap protein target PPAR- γ dan SUR1.

Ketiga, senyawa aktif daun kelor seperti flavonoid dan asam fenolik berpotensi terhadap protein target PPAR- γ dan SUR1 diprediksi aman secara *in silico* berdasarkan parameter toksisitas yang dievaluasi menggunakan Toxtree, meliputi uji mutagenisitas/Ames dan aturan *Cramer rules*.