

## PENAMBATAN MOLEKULER FOSFODIESTERASE TIPE 5 OLEH SENYAWA AKTIF ICARIIN SEBAGAI TERAPI DISFUNGSI EREKSI

Septiana Indratmoko<sup>1,2, \*</sup>, Laela Hayu Nurani<sup>1</sup>, Iis Wahyuningsih<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Jl. Prof. DR. Soepomo Sh,  
Warungboto, Kec. Umbulharjo, Kota Yogyakarta, Daerah Istimewa Yogyakarta,  
55164, Telp (0274) 563515, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Sains dan Teknologi, Universitas Al-Irsyad Cilacap, Jl. Cerme  
24 Cilacap, Jawa Tengah, Indonesia.

### ABSTRACT

Erectile dysfunction is caused by the high activity of type 5 phosphodiesterase (PDE5), which leads to a decrease in the breakdown of cGMP, continuous relaxation of smooth muscles of the penis, and imperfections of the penis. PDE5 needs to be inhibited in cGMP degradation in order for cGMP levels to increase and cause smooth muscle contractions to last longer so that the penis can get an erection. Icariin has been reported to have properties as an aphrodisiac, however the interaction and bioactivity effect of such compounds on the PDE5 enzyme is not yet known. The purpose of this study was to see if the bioactive compound icariin could treat erectile dysfunction by interfering with the enzyme PDE5. This study used several software programs, including PyRx, Discovery Studio Visualizer, AutoDock Tools, AutoDock Vina, and Ligplot+. The receptor is PDE5 with the code PDB:2H42 and the comparative ligand is sildenafil. The results of the mooring of molecules were analyzed using the parameters of energy affinity ( $\Delta G$ ). The interactions that occur are the presence of hydrogen carbon bonds, pi-sigma bonds and alkyl bonds. Icariin compounds are able to inhibit the activity of the PDE5 enzyme with a docking value of -9.2 kcal / mol while sildenafil inhibits the activity of the PDE5 enzyme with a docking value of -8.2 kcal / mol. In conclusion, icariin has the ability to inhibit the enzyme PDE5 in erection treatment.

**Keywords:** icariin; in silico; erectile dysfunction; PDE5

### PENDAHULUAN

Disfungsi seksual pria mengacu pada ketidakmampuan untuk mencapai hubungan seksual yang memuaskan dan termasuk disfungsi ereksi, libido berkurang, dan ejakulasi abnormal (Sin, Anand, & Koh, 2021). Disfungsi ereksi adalah salah satu disfungsi seksual yang paling umum, dan diperkirakan 5-20% pria terkena disfungsi ereksi sedang hingga berat di seluruh dunia dan memberikan dampak yang cukup besar pada psikologi dan kualitas hidup laki-laki seperti kecemasan dan depresi (Gong, Ma, Xie, Yang, & Huang, 2017) (Grice et al., 2020). Penggunaan obat dengan target menghambat phosphodiesterase tipe 5 seperti sildenafil, sildenafil, vardenafil, dan avanafil adalah salah satu pilihan utama untuk pengobatan disfungsi ereksi (Sin et al., 2021). Namun, penggunaan senyawa sintesis penghambat phosphodiesterase tipe 5 menyebabkan beberapa efek samping seperti sakit kepala, priapism, kemerahan dan gangguan penglihatan (Anand Ganapathy, Hari Priya, & Kumaran, 2021).

Dalam beberapa tahun terakhir, senyawa yang berasal dari tumbuhan semakin banyak diteliti karena keamanannya dalam pengobatan disfungsi seksual (Bellik et al., 2013). Salah satunya adalah tanaman epimedium. Kandungan utama pada tanaman epimedium yaitu icariin (Shindel et al., 2010). Icariin memiliki berbagai efek farmakologi seperti anti-osteoporosis (X. F. Li et al., 2013), perlindungan kardiovaskular (Zhou et al., 2014), anti-tumor (W. Li et al., 2014), anti-inflamasi (Tao et al., 2013), imunoproteksi (Sun et al., 2013) dan perbaikan disfungsi seksual

(Liu et al., 2011). Berdasarkan penelitian icariin dapat memperbaiki masalah disfungsi ereksi dengan cara menghambat cGMP phosphodiesterase-5 (PDE5) (Dell'Agli et al., 2008).

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini dapat dijadikan sebagai peluang dalam pengembangan desain obat baru sehingga dapat membatasi penggunaan hewan percobaan karena waktu dan biaya yang tinggi serta perlu adanya kode etik penggunaan hewan uji. Oleh karena itu, *in silico* mulai diminati karena keuntungannya yang murah dan memberikan hasil yang lebih cepat. *In silico* merupakan metode penelitian yang menggunakan teknologi komputer dan database untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut (Makatita et al., 2020). Metode *in silico* yang paling umum digunakan adalah penambatan molekuler. Metode ini digunakan untuk mengetahui interaksi suatu senyawa dengan molekul target. Pada penelitian ini akan dilakukan penambatan molekuler antara senyawa icariin dengan reseptor PDE5 yang akan dilakukan secara *in silico*. Struktur ligan dan protein akan didownload dari database Databank Protein dan Marvin Sketch, selanjutnya akan dilakukan penambatan molekuler menggunakan software AutoDock Vina untuk menentukan interaksi dan afinitas pengikatan sehingga senyawa kimia icariin dapat digunakan sebagai dasar untuk menemukan obat yang mungkin menjadi kandidat sebagai obat disfungsi ereksi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan metode *in silico*. Penelitian ini akan melakukan molekuler docking senyawa ICARIIN ke reseptor PDE5 untuk mengetahui interaksinya sebagai kandidat antikanker. Pengujian yang dilakukan adalah preparasi ligan, preparasi reseptor, validasi, molecular docking menggunakan *pyrx-autodock vina* dan visualisasi dengan *biovia discovery studio visualizer*.

### Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah perangkat keras berupa Laptop Lenovo-Yoga dengan processor Intel(R) Core(TM) i5-7200U CPU @ 2.50GHz 2.70 GHz, RAM 4,00 GB. Perangkat lunak yang digunakan adalah *Pyrx-Autodock* dan *Vina*, *Marvin Sketch*, dan *BIOVIA Discovery Studio*.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian *in silico* adalah struktur senyawa alam yang berpotensi sebagai afrodisiak, yaitu senyawa *icariin* yang disiapkan dengan menggunakan aplikasi *Marvin Sketch*, dan makromolekul PDE5 yang diunduh di *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Senyawa kimia Sildenafil yang diunduh di *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Prosedur Penelitian

#### Persiapan Ligan dan Protein Target

Struktur senyawa alami *icariin* dan turunannya disiapkan dengan menggunakan *Marvin Sketch* dalam bentuk 2D dan dikonversi ke dalam bentuk 3D dengan format PDB. Struktur protein PDE5 diunduh dalam *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) dengan format PDB.

#### Preparasi Ligan dan Protein Target

Struktur ligan yang telah diubah ke dalam bentuk struktur 3D dalam format PDB kemudian dilakukan optimasi dalam aplikasi *BIOVIA Discovery Studio*. Ditambahkan hidrogen polar pada pilihan `chemistry>>hydrogen>>add>>polar only>>ok`. Protein PDE5 dalam format PDB dioptimasi dalam aplikasi *Discovery Studio*. Protein dibersihkan dari molekul air agar tidak mengganggu pada saat simulasi *docking* dilakukan. Ditambahkan hidrogen polar pada pilihan `chemistry>>hydrogen>>add>>polar only>>ok`. Struktur ligan dan reseptor kemudian dibuka dengan aplikasi *Pyrx-AutoDock* terlebih dahulu untuk mempersiapkan reseptor, tahapannya sebagai berikut: ditambahkan ligan dan reseptor format PDB dalam aplikasi *Pyrx-AutoDock* selanjutnya pilih file ligan dan *convert to pdbqt*. Selanjutnya ligan dan reseptor akan terdisplay dalam format PDBQT.

### Validasi

Proses validasi molecular *docking* dilakukan dengan menggunakan aplikasi Pyrx dengan mempersiapkan tempat dimana ligan akan menghambat pada reseptor dengan cara mengatur *gridbox* pada sisi aktif reseptor atau dengan menutupi seluruh bagian molekul. Sesuaikan *gridbox* pada koordinat (center x, y, z) yang ditentukan.

#### **Penambatan Senyawa *Icarin* pada PDE5**

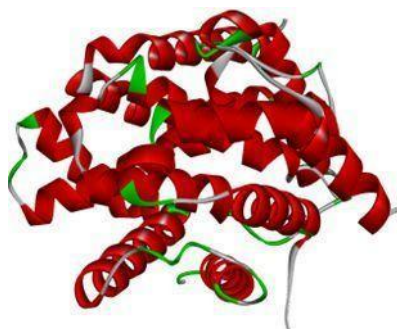
Selanjutnya dalam aplikasi Pyrx di running menggunakan vina wizard dan ditunggu sampai proses running selesai. Setelah *docking* molekul selesai maka akan muncul hasil binding dari ligan yang diteliti. Simpan data excel yang berisi nilai energi ikatannya dan simpan hasil *docking* antara ligan dan reseptor dalam format PDB.

#### **Visualisasi Struktur**

Tahap terakhir pada proses molecular *docking* yaitu visualisasi. Hasil *docking* dengan konformasi terbaik kemudian dianalisa menggunakan *Discovery Studio* kemudian dilihat hasilnya dalam bentuk 2D dan 3D. parameter yang dianalisa meliputi residu asam amino, ikatan hidrogen, ikatan van der waals dan energi bebas ikatan.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Melalui penelitian ini akan dilakukan identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi terhadap afinitas pengikatan dan interaksi molekular yang terbentuk sehingga mampu mendeskripsikan mekanisme aksi dari molekul senyawa icariin terhadap reseptor enzim PDE5. Struktur kristal makromolekul protein PDE5 dipilih sebagai reseptor target. Makromolekul protein tersebut terlebih dahulu dilakukan preparasi dengan menghilangkan molekul air dan ligan alami, selanjutnya dilakukan penambahan atom hidrogen polar. Tahapan preparasi makromolekul protein PDE5 ini bertujuan untuk memastikan agar terbentuk interaksi molekular yang stabil pada bagian situs aktif pengikatan dari makromolekul protein target.



**Gambar 1. Struktur Kristal Makromolekul Protein PDE5**

Struktur protein PDE5 diunduh dalam *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) dengan format PDB. Struktur Kristal Makromolekul Protein PDE5 dapat dilihat pada gambar 1.

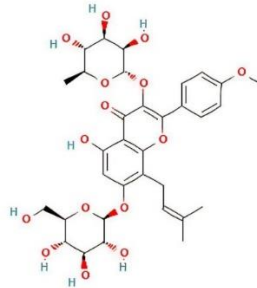
#### **Validasi**

Validasi dilakukan tanpa adanya air, karena air menghalangi pengikatan ligan pada reseptor dan air dapat membentuk ikatan hidrogen dengan reseptor (Ruswanto et al., 2018). Validasi penambatan dilakukan dengan mengatur *gridbox*. *Gridbox* disesuaikan dengan koordinat tengah  $x=39,15$ ;  $y = 12,33$ ;  $z = 60,88$ , dimensi  $x = 55,28$ ,  $y = 51,65$ ,  $z = 59,05$  angstrom. Kemudian proses penambatan menggunakan program Pyrx-Autodock Vina untuk menghasilkan RMSD (Root Mean Square Deviation). RMSD menunjukkan jarak antar atom dalam konformasi, dengan

nilai RMSD yang lebih kecil menunjukkan lebih dekat ke konformasi asli ligan dan posisi ligan yang lebih baik. Nilai RMSD tergantung pada ikatan dan interaksi energik antara protein dan ligan, semakin kecil nilai RMSD, semakin mirip struktur ligan yang bereaksi.

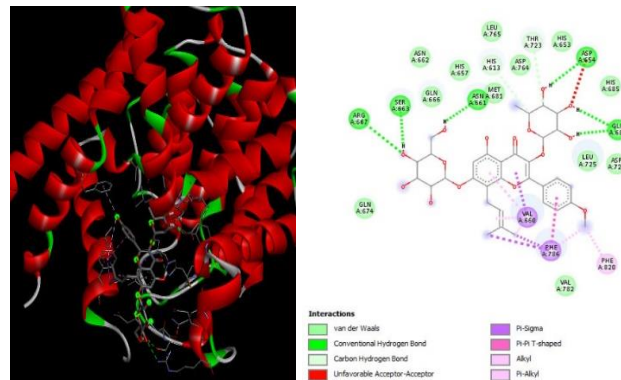
### Penambatan Senyawa Icariin pada PDE5

Simulasi penambatan molekular ligan-protein dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock untuk mengamati afinitas molekul senyawa icariin, serta mengidentifikasi dan mengevaluasi interaksi molekular yang terbentuk terhadap makromolekul protein PDE5.

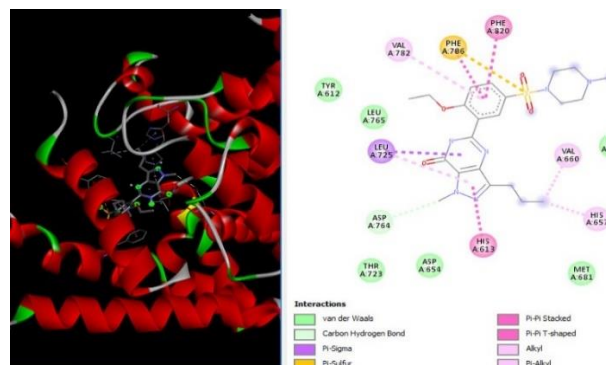


Gambar 2. Struktur kimia senyawa icariin

Preparasi molekul senyawa icariin dilakukan dengan tujuan agar kedua senyawa tersebut mendekati keadaan aslinya dan mampu membentuk ikatan molekular dengan bagian area situs aktif pengikatan dari makromolekul protein PDE5. Struktur kimia senyawa icariin diperoleh dari Pubchem dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 3. Interaksi Molekul Icariin terhadap Residu Asam Amino Reseptor PDE5



Gambar 4. Interaksi Molekul Sildenafil terhadap Residu Asam Amino Reseptor PDE5

Format file dari senyawa icariin dibuat secara otomatis oleh program open babel, kemudian dilakukan pengaturan *gridbox* yang sama dengan validasi penambatan dilakukan proses penambatan seluruh ligan uji. Hasil dari penambatan berupa nilai RMSD dan energi bebas gibbs ( $\Delta G$ ), serta konformasi ligan dengan format file, pdbqt. Sildenafil merupakan senyawa obat yang terbukti dapat menghambat enzim PDE5. PDE5-sildenafil berinteraksi dengan satu molekul PDE5 dalam struktur kompleks dengan afinitas tinggi antara PDE5 dan sildenafil. Interaksi yang terjadi antara PDE5 dan sildenafil yaitu ikatan Pi-sulfur, pi-sigma, pi-pi stacked, alkyl. Hal ini menunjukkan interaksi yang kuat dan stabil antara kedua protein dan dapat menjelaskan afinitas pengikatannya yang tinggi. Interaksi molekul antara senyawa ligan dengan reseptor dapat dilihat pada gambar 3 dan 4.

**Tabel 1. Hasil Penambatan Molekul Ligan protein**

Senyawa	Docking score	Ikatan	Residu
Icariin	-9,2	Ikatan karbon hidrogen, pi-sigma, alkil	<b>VAL A:660, PHE A786, PHE A:820, ARG A:667, SER A:663, ASN A:661, ASP A:654, GLU A:682,</b>
Sildenafil	-8,2	Pi-sulfur, pi-sigma, pi-pi stacked, alkyl	<b>VAL A:660, HIS A:657, HIS A:613, ASP A:764, LEU A:725, VAL A:782, PHE A:786, PHE A:820</b>

Skor docking atau energi bebas pengikatan menggambarkan kekuatan atau afinitas pengikatan yang dihasilkan dari interaksi energi rendah ligan dan reseptor dalam pembentukan kompleks reseptor-obat. Energi ikatan hasil evaluasi diwakili oleh energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ). Data ini menunjukkan stabilitas interaksi ligan-reseptor (pengikatan) di situs pengikatan. Jika  $G < 0$ , tidak terjadi reaksi (reaksi berlanjut ke reaktan). Semakin kecil nilai  $G$ , semakin kuat dan stabil ikatan antara ligan dan reseptor. Senyawa icariin bernilai negatif, artinya reaksi berlangsung spontan dan berlangsung (reaksi terhadap produk), menstabilkan pengikatan ligan uji icariin pada reseptor PDE5. Nilai  $G$  menunjukkan jumlah energi yang dilepaskan suatu senyawa untuk berinteraksi atau berikatan dengan reseptornya. Semakin kecil angka atau semakin besar tanda minus, semakin banyak energi yang digunakan untuk membentuk ikatan, membuat ikatan semakin kuat.

Visualisasi hasil docking dan analisis interaksi dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil docking antara ligan pembanding dengan ligan uji yang digunakan. Hasil visualisasi ini adalah interaksi residu asam amino pada ligan. Adanya interaksi asam amino yang relevan memungkinkan terjadinya kontak antara ligan referensi dan ligan uji yang digunakan. Hasil visualisasi ini adalah interaksi residu asam amino dengan ligan. Adanya interaksi ini memungkinkan kontak antara ligan dan reseptor menunjukkan aktivitas penghambatan. Tabel 1 menunjukkan bahwa senyawa icariin menunjukkan interaksi ikatan hidrogen, ikatan pi-sigma, dan ikatan alkil dengan reseptor PDE5. Interaksi icariin memiliki residu asam amino yang sama dengan sildenafil, tiga diantaranya adalah VAL A:660, PHE A:786, dan PHE A:820. Kesamaan

aktivitas dan sifat interaksi dikonfirmasi oleh kesamaan hasil residu asam amino antara ligan uji dan pembanding (sildenafil).

## KESIMPULAN

Melalui penelitian ini dilakukan identifikasi, evaluasi dan eksplorasi afinitas dan interaksi molekuler untuk mendeskripsikan mekanisme kerja senyawa icariin pada makromolekul protein PDE5. Senyawa icariin memiliki interaksi dengan reseptor PDE5 terutama melalui pembentukan ikatan antara lain ikatan hidrogen, pi-sigma, alkil. Senyawa icariin memiliki residu asam amino yang sama dengan sildenafil, yaitu VAL A: 660, PHE A:786 dan PHE A: 820. Kesamaan residu asam amino menjadikan icariin sebagai kandidat potensial untuk obat disfungsi ereksi.

## PUSTAKA

- Anand Ganapathy, A., Hari Priya, V. M., & Kumaran, A. (2021). Medicinal plants as a potential source of Phosphodiesterase-5 inhibitors: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113536. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113536>
- Bellik, Y., Boukraâ, L., Alzahrani, H. A., Bakhotmah, B. A., Abdellah, F., Hammoudi, S. M., & Iguer-Ouada, M. (2013). Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-Allergic activities of phytochemicals: An update. *Molecules*, 18(1), 322–353. <https://doi.org/10.3390/molecules18010322>
- Dell'Agli, M., Galli, G. V., Dal Cero, E., Belluti, F., Matera, R., Zironi, E., ... Bosisio, E. (2008). Potent inhibition of human phosphodiesterase-5 by icariin derivatives. *Journal of Natural Products*, 71(9), 1513–1517. <https://doi.org/10.1021/np800049y>
- Gong, B., Ma, M., Xie, W., Yang, X., & Huang, Y. (2017). Direct comparison of sildenafil with sildenafil for the treatment of erectile dysfunction : a systematic review and meta - analysis. *International Urology and Nephrology*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1644-5>
- Grice, P. T., Liu, J., Gabrielson, A. T., Pearce, I., Bivalacqua, T. J., & Modgil, V. (2020). Drug delivery options and therapeutic advances in the management of erectile dysfunction. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(9), 1259–1268. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1782383>
- Li, W., Wang, M., Wang, L., Ji, S., Zhang, J., & Zhang, C. (2014). Icariin Synergizes with Arsenic Trioxide to Suppress Human Hepatocellular Carcinoma. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(2), 427–436. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9724-3>
- Li, X. F., Xu, H., Zhao, Y. J., Tang, D. Z., Xu, G. H., Holz, J., ... Wang, Y. J. (2013). Icariin augments bone formation and reverses the phenotypes of osteoprotegerin-deficient mice through the activation of WNT/  $\beta$  -Catenin-BMP Signaling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/652317>
- Liu, T., Xin, H., Li, W. R., Zhou, F., Li, G. Y., Gong, Y. Q., ... Xin, Z. C. (2011). Effects of icariin on improving erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Sexual Medicine*, 8(10), 2761–2772. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02421.x>
- Makatita, F. A., Wardhani, R., & Nuraini. (2020). Riset in Silico Dalam Pengembangan Sains Di Bidang Pendidikan, Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana Sebagai Agen Anti-Aging. *Jurnal ABDI*, 2(1), 33–39.

- Ruswanto, R., Garna, I. M., Tuslinah, L., Mardianingrum, R., Lestari, T., & Nofianti, T. (2018). Kuersetin, Penghambat Uridin 5-Monofosfat Sintase Sebagai Kandidat Anti-kanker. *ALCHEMY Jurnal Peneliti*
- Shindel, A. W., Xin, Z. C., Lin, G., Fandel, T. M., Huang, Y. C., Banie, L., ... Lue, T. F. (2010). Erectogenic and neurotrophic effects of icariin, a purified extract of horny goat weed (*Epimedium spp.*) in vitro and in vivo. *Journal of Sexual Medicine*, 7(4 PART 1), 1518–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01699.x>
- Sin, V. J. E., Anand, G. S., & Koh, H. L. (2021). Botanical Medicine and Natural Products Used for Erectile Dysfunction. *Sexual Medicine Reviews*, 9(4), 568–592. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2020.10.005>
- Sun, P., Liu, Y., Deng, X., Yu, C., Dai, N., Yuan, X., ... Pang, H. (2013). An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis. *Phytomedicine*, 20(11), 975–979. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.04.019>
- Tao, F., Qian, C., Guo, W., Luo, Q., Xu, Q., & Sun, Y. (2013). Inhibition of Th1 / Th17 responses via suppression of STAT1 and STAT3 activation contributes to the amelioration of murine experimental colitis by a natural flavonoid glucoside icariin. *Biochemical Pharmacology*, 85(6), 798–807. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.002>
- Zhou, H., Yuan, Y., Liu, Y., Deng, W., Zong, J., Bian, Z. Y., ... Tang, Q. Z. (2014). Icariin attenuates angiotensin II-induced hypertrophy and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species-dependent JNK and p38 pathways. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(5), 1116–1122. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1598>