



## PERBANDINGAN TAMPILAN *LIPINSKI'S RULE OF FIVE PEPTIDA* AKIBAT ALEL A1/A2 GEN *CSN2* SAPI PERAH

Hermawan Setyo Widodo<sup>1\*</sup>, Merryafinola Ifani<sup>1</sup>, Rizak Tiara Yusan<sup>2</sup>, Yusuf Subagyo<sup>1</sup>, dan Afduha Nurus Syamsi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

\*Email korespondensi: hsw@unsoed.ac.id

**Abstrak.** Keragaman gen *CSN2* menyebabkan perubahan urutan asam amino dari histidin pada alel A1 menjadi proline pada A2. Keragaman tersebut dapat memberikan potensi adanya perbedaan sifat peptida yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan peptida bioaktif dan karakteristik *druglikeness*. Penelitian ini dilakukan secara *in silico* meliputi pemotongan sekuens protein oleh enzim tripsin, kimotripsin dan pepsin. Peptida spesifik dari alel A1 dan A2 selanjutnya dibandingkan sifat bioavailabilitasnya berdasarkan Lipinski's rule of 5. Hasil yang diperoleh yakni terdapat peptida unik VYFPFGPIPNLSL dari alel A2 dan VYFPFGPIHNSL dari alel A1. Kedua peptida memiliki berat molekul, jumlah donor H, jumlah akseptor H, LogP dan TPSA berurutan yakni 1300,52vs.1340,55Da; 12vs.14; 16vs.17; -1,806vs.-2,346; 431,81vs.469,28. Kedua peptida melanggar kriteria Lipinski's Rule of 5, sehingga tidak dapat diserap ke dalam tubuh. Simpulan yang diambil yakni alel A1 dan A1 gen *CSN2* menghasilkan peptida unik, namun tidak dapat diserap tubuh.

**Kata kunci:** Lipinski's rule of 5, peptida, kasein beta, susu

**Abstract.** The diversity of *CSN2* gene conducting a change in the sequence of amino acids from histidine in the alel A1 to proline in A2. This diversity can provide the potential for differences in the properties of peptides produced. This study aims to determine the differences in bioactive peptide and druglikeness characteristics. This study was conducted *in silico* including cutting protein sequences by the enzymes of trypsin, kimotripsin and pepsin. Specific peptides of Alel A1 and A2 are then compared to their bioavailability based on Lipinski's Rule of 5. The results obtained are the unique peptide namely VYFPFGPNLSL from Alel A2 and VYFPFGPIHNSL from Alel A1. Both peptides have molecular weight, number of H donors, number of H acceptors, logp and sequential TPSA are 1300.52VS.1340.55DA; 12VS.14; 16VS.17; -1,806VS.-2,346; 431,81VS.469.28. Both peptides violate the criteria for Lipinski's Rule of 5, so it cannot be absorbed into the body. The conclusions taken namely Alel A1 and A1 *CSN2* gene produce unique peptides, but cannot be absorbed by the body.

**Keywords:** Lipinski's rule of 5, peptide, casein beta, milk

### Pendahuluan

Susu sapi memiliki banyak sekali protein yang dapat menjadi peptida bioaktif jika diolah lebih lanjut. Protein paling dominan pada susu sapi yakni kasein meliputi kasein  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2$  dan  $\kappa$ . Setiap protein tersebut dihasilkan atas proses translasi dari gen penyandinya masing masing. Gen penyandi kasein secara berurutan yakni *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* dan *CSN3* (Widodo et al., 2021).

Keragaman atau polimorfisme telah ditemukan pada gen-gen penyandi kasein tersebut. Keragaman ini bahkan ditemukan sangat banyak dan memiliki karakteristiknya masing-masing. Keragaman gen dapat berupa insersi, delesi dan substitusi nukleotida pada urutan DNA (Pizarro et al., 2020; Vacca et al., 2014). Hal tersebut menyebabkan adanya perubahan asam amino yang diterjemahkan hingga perbedaan kemampuan ekspresi kasein.

Gen *CSN2* pada sapi memiliki prevalensi keragaman yang tinggi pula (Li et al., 2022). Gen ini telah ditemukan sebanyak 16 keragaman yang berbeda dan menyebabkan perbedaan ekspresi. Hal tersebut menyebabkan perubahan ekspresi penerjemahan dari asam amino histidin pada alel A1 menjadi prolin pada alel A2. Urutan asam amino ke-67 yang berupa histidin tersebut dapat menghasilkan peptida  $\beta$ casomorphine-7 (BCM7) apabila dicerna oleh enzim elastase (Hallén et al., 2008). Peptida tersebut memiliki sifat opioid dan dapat menyebabkan iritasi serta dampak negatif

lain. Hal tersebut memberikan stigma negatif pada sapi dengan alel A1 serta positif pada alel A2 karena dampak yang akan diperoleh konsumen.

Keragaman tersebut dapat dikaji lebih jauh dengan simulasi pencernaan oleh enzim di dalam lambung manusia. Kedua sekuens protein dapat dicerna oleh enzim tripsin, kimotripsin dan pepsin, sehingga akan menghasilkan peptida bioaktif yang potensial (Widodo et al., 2019). Peptida bioaktif tidak akan berfungsi jika tidak dapat diserap oleh tubuh, sehingga perlu dikaji berdasarkan Lipinski's rule of 5 (Ro5). Lipinski's Ro5 dapat digunakan untuk menggambarkan *druglikeness* yakni pertimbangan sebuah molekul dapat diserap oleh tubuh atau tidak seperti halnya obat. Parameter ini mencakup ukuran molekul, donor hidrogen, akseptor hidrogen, logP dan kepolaran permukaan molekul (Benet et al., 2016). Perbedaan asam amino dapat mengubah sifat yang dihasilkan dan perlu dibuktikan secara perhitungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya peptida dan perbedaan sifat Ro5 dari peptida yang dihasilkan atas keragaman A1/A2 gen *CSN2*.

## Metode dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode *in silico*. Metode ini memanfaatkan aplikasi luring dan daring untuk memperoleh informasi yang dibutuhkan.

### Materi

Penelitian ini menggunakan peralatan komputer yang terhubung secara daring pada internet. Komputer yang digunakan memiliki spesifikasi CPU AMD 2,3GHz; RAM 8GB; ROM 512Gb; OS Win10. Aplikasi yang dibutuhkan yakni web browser Google Chrome.

### Metode

#### **Persiapan sekuens protein kasein $\beta$**

Sekuens atau urutan asam amino kasein ini diperoleh secara daring dengan mengakses laman (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/>) dengan kode akses sekuens P02666 sebagai kasein  $\beta$  Bos taurus dengan alel A2. Sekuens yang diperoleh diubah pada urutan ke-83 dari prolin (P) menjadi histidin (H) sebagai alel A1.

#### **Pemotongan sekuens asam amino menggunakan aplikasi peptide cutter**

Aplikasi ini dapat mensimulasikan pemotongan protein menjadi peptida dengan memilih enzim yang digunakan. Aplikasi dapat diakses pada laman ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)). Sekuens asam amino dientrikan pada kolom pengisian. Penelitian ini menggunakan enzim pencernaan berupa tripsin, kimotripsin dan pepsin, sehingga dipilih enzim tersebut pada pilihan yang tersedia. Hasil yang diperoleh ditampilkan secara langsung dan dapat diketahui titik pemotongan yang dihasilkan. Sekuens peptida yang paling unik dan dihasilkan dari keragaman A1/A2 dipilih untuk diujikan nilai Ro5.

#### **Pembentukan struktur 3 dimensi**

Peptida yang dipilih perlu diubah menjadi struktur 3 dimensi secara virtual. Sekuens asam amino peptida terlebih dahulu diubah menjadi kode SMILE dengan mengakses laman (<https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string/>). Kode SMILE tersebut kemudian ditransformasikan menjadi bentuk 3 dimensi menggunakan aplikasi AVOGADRO. Hasil transformasi disimpan dalam bentuk file dengan ekstensi *.mol*.

### Perhitungan nilai druglikeness menggunakan Lipinski's Ro5

Nilai Lipinski's rule of 5 dari kode SMILE setiap peptida unik yang terbentuk dilakukan menggunakan bantuan aplikasi ADME Calculator yang dapat diakses melalui (<https://armakovic.com/online-tools/adme-calculator/>). File .mol yang telah terbentuk diunggah pada aplikasi dan perhitungan nilai Ro5 akan muncul.

### Analisis data

Data yang diperoleh selanjutnya disajikan secara deskriptif serta diambil gambarnya sebagai bukti visual.

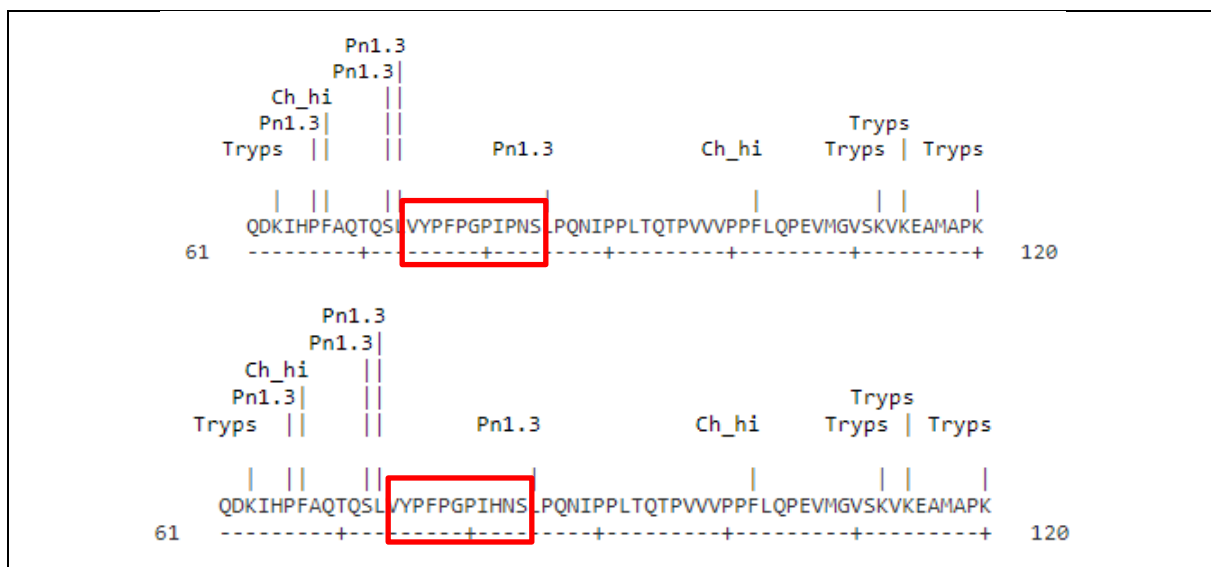
## Hasil dan Pembahasan

### Pemotongan peptida

Sekuens peptida yang digunakan pada dari kedua alel memiliki urutan yang hampir sama. Kedua protein memiliki 224 residu asam amino, namun terdapat perbedaan pada urutan ke-82 yakni P pada alel A2 dan H pada alel A1. Hal ini memberikan gambaran berupa adanya perbedaan satu buah asam amino dari kedua sekuens yang hampir sama. Sekuens lengkap dari protein kasein  $\beta$  yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 1.

10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
MKVLILACLV	ALALARELEE	LNVPEIVES	LSSSEESITR	INKKIEKFQS	EEQQQTEDEL	MKVLILACLV	ALALARELEE	LNVPEIVES	LSSSEESITR	INKKIEKFQS	EEQQQTEDEL
70	80	90	100	110	120	70	80	90	100	110	120
QDKIHPFAQT	QSLVYFPFGP	IPNSLPQNI	PLTQTPVVVP	PFLQPEVMGV	SKVKEAMAPK	QDKIHPFAQT	QSLVYFPFGP	IHNSLPQNI	PLTQTPVVVP	PFLQPEVMGV	SKVKEAMAPK
130	140	150	160	170	180	130	140	150	160	170	180
HKEMPFKYP	VEPFTESQSL	TLTDVENLHL	PLPLLQSNMH	QPHQPLPPTV	MFPPQSVLSL	HKEMPFKYP	VEPFTESQSL	TLTDVENLHL	PLPLLQSNMH	QPHQPLPPTV	MFPPQSVLSL
190	200	210	220	190	200	210	220				
SQSKVLPVPQ	KAVPYPQRDM	PIQAFLLYQE	PVLGPVRGPF	PIIV	SQSKVLPVPQ	KAVPYPQRDM	PIQAFLLYQE	PVLGPVRGPF	PIIV		

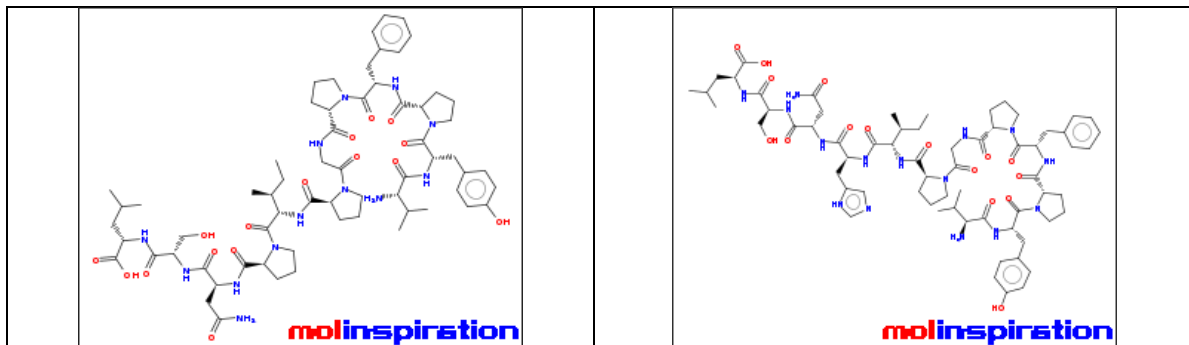
Gambar 1. Sekuens asam amino kasein  $\beta$  dengan alel A2 (kiri) dan alel A1 (kanan)



Gambar 2. Pemotongan sekuens kasein  $\beta$  dari alel A2 (atas) dan A1 (bawah) menghasilkan 2 peptida yang unik.

Pemotongan sekuens protein tersebut secara simulasi menunjukkan adanya peptida unik antara kedua alel. Peptida unik hasil dari pemotongan sekuens kasein  $\beta$  alel A2 yakni VYFPFGPIPNSL.

Peptida unik dari alel A1 protein kasein  $\beta$  yakni VYPPGPIHNSL. Kedua peptida ini merupakan hasil pemotongan oleh enzim pepsin yang bekerja pada pH1,3 (Ibrahim et al., 2017). Enzim pepsin memotong asam amino urutan ke-73 dan 86 dan menghasilkan fragmen sebanyak 12 buah residu dari asam amino ke-74 hingga 85. Kedua peptida ini memiliki perbedaan pada residu asam amino ke-9 yakni prolin (P) pada alel A2 dan histidin (H) pada A1. Hal ini sesuai dengan beberapa hasil studi yang membuktikan adanya perbedaan urutan asam amino akibat alel A1 dan A2 pada gen *CSN2* sapi perah. Peptida unik tersebut selanjutnya dianalisis untuk penghitungan nilai Ro5. Peta pemotongan enzim pepsin tersebut disajikan pada Gambar 2. Ilustrasi struktur kedua peptida tersebut disajikan pada Gambar 3. Struktur peptida menggambarkan adanya penambahan beberapa ikatan hidrogen karena perubahan residu asam amino, sehingga menyebabkan perbedaan tampilan *druglikeness*



Gambar 3. Struktur peptida hasil pemotongan kasein  $\beta$  dari alel A2 (kiri) dan A1 (kanan).

### Perbandingan tampilan *druglikeness*

Hasil perhitungan nilai Lipinski's Rule of 5 sebagai parameter *druglikeness* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan nilai Lipinski's Rule of 5 dari paptida unik yang dihasilkan.

Parameter	Alel A2 (VYPPGPIPNLSL)	Alel A1 (VYPPGPIHNSL)	Kriteria Lipinski's Ro5
Berat molekul (Da)	1300,52	1340,55	<500Da
Jumlah donor H	12	14	<5
Jumlah akseptor H	16	17	<10
LogP	-1,806	-2,346	<5 (1 sd 4)
TPSA (A <sup>2</sup> )	431,81	469,28	<140

Keterangan: TPSA=topological polar surface area.

Kedua molekul memiliki berat molekul yang berbeda akibat sebuah perubahan residu asam amino. Peptida yang dihasilkan alel A1 memiliki selisih lebih berat sebesar 40Da dibanding A2. Berat molekul yang disarankan pada Lipinski's Ro5 untuk molekul obat yakni kurang dari 500Da, sehingga kedua peptida melanggar kriteria ini. Molekul yang lebih kecil akan mempermudah penyerapan pada saluran pencernaan dibandingkan molekul yang lebih besar (Coimbra et al., 2021).

Jumlah donor hidrogen pada kedua molekul memiliki nilai yang berbeda yakni 12 dan 14. Jumlah akseptor keduanya memiliki perbedaan pula yakni 16 dan 17. Kedua hasil tersebut melanggar kriteria Lipinski's Ro5 yakni donor hidrogen tidak lebih dari 5 dan akseptor hidrogen tidak lebih dari 10. Semakin meningkatnya hidrogen donor dan akseptor menyebabkan sebuah molekul akan mengubah nilai polaritasnya (Chen et al., 2016). Hal ini menyebabkan perbedaan difusi pasif pada membran sel, sehingga menyebabkan perubahan penyerapan molekul (Gao et al., 2017).

Nilai Log P pada kedua molekul memiliki perbedaan yakni -1,806 dan -2,346. Kenegativitasan molekul lebih kuat pada alel A1. Nilai LogP menggambarkan sifat lipofilik suatu molekul karena mengelompokkan molekul terlarut pada oktanol atau air (Daina et al., 2017). Hasil dari nilai tersebut sesuai dengan kriteria pada kedua peptida. Walaupun demikian, referensi terbaru menyarankan nilai LogP yang baik yakni antara 1 sampai 4, sehingga kedua peptida melanggar kriteria ini (Thompson et al., 2006).

Nilai TPSA menunjukkan hasil yang besar pada kedua peptida yakni 431,81 dan 469,28A. Nilai ini melebihi kriteria Lipinski's rule of 5 yakni kurang dari 140A. Nilai TPSA menggambarkan kepolaran permukaan sebuah molekul berdasarkan unsur penyusunnya (Maximo da Silva et al., 2015). Semakin tinggi nilai TPSA menggambarkan permukaan yang semakin polar dan menghambat penetrasi dinding mikrofili usus (Hamley, 2017). Kedua peptida memiliki TPSA yang terlampaui tinggi sehingga secara teoritis penyerapan di saluran pencernaan tidak optimal.

## Kesimpulan

Simpulan yang dapat ditarik yakni alel A1 dan A2 gen *CSN2* sapi perah dapat menghasilkan peptida unik, namun keduanya tidak bisa diserap secara baik pada saluran pencernaan seperti halnya obat.

## Daftar Pustaka

- Benet, LZ, CM Hosey, O Ursu dan TI Oprea. 2016. BDDCS The Rule of 5 and Drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 101 : 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.007>
- Chen, D, N Oezguen, P Urvil, C Ferguson, SM Dann, dan TC Savidge. 2016. Regulation of Protein-ligand Binding Affinity by Hydrogen Bond Pairing. *Science Advances*. 2(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>
- Coimbra, JTS, R Feghali, RP Ribeiro, MJ Ramos, dan PA Fernandes. 2021. The Importance of Intramolecular Hydrogen Bonds on The Translocation of The Small Drug Piracetam Through a Lipid Bilayer. *RSC Advances*. 11(2) : 899–908. <https://doi.org/10.1039/D0RA09995C>
- Daina, A, O Michielin dan V Zoete. 2017. SwissADME: A Free Web Tool To Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness And Medicinal Chemistry Friendliness Of Small Molecules. *Scientific Reports*, 7(1) : 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Gao, Y, C Gesenberg, dan W Zheng. 2017. Oral Formulations for Preclinical Studies. In *Developing Solid Oral Dosage Forms*. 455–495. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00017-0>
- Hallén, E, A Wedholm, A Andrén dan A Lundén. 2008. Effect Of B-Casein, K-Casein And B-Lactoglobulin Genotypes On Concentration Of Milk Protein Variants. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 125(2): 119–129. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0388.2007.00706.X>
- Hamley, IW. 2017. Small Bioactive Peptides for Biomaterials Design and Therapeutics. *Chemical Reviews*. 117(24) : 14015–14041. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00522>
- Ibrahim, HR, AS Ahmed, dan T Miyata. 2017. Novel Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides From Caseins And Whey Proteins Of Goat Milk. *Journal of Advanced Research*. 8(1) : 63. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2016.12.002>
- Li, X, GWK Spencer, L Ong, dan SL Gras. 2022. Beta Casein Proteins – A Comparison Between Caprine And Bovine Milk. *Trends in Food Science & Technology*. 121, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.023>
- Maximo da Silva, M, M Comin, TS Duarte, M Foglio, J de Carvalho, M do Carmo Vieira, dan AN Formagio. 2015. Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Properties Predictions of Galloyl Derivatives. *Molecules*. 20(4) : 5360–5373. <https://doi.org/10.3390/molecules20045360>
- Pizarro, MG, V Landi, FJ Navas, JM León, A Martínez, J Fernández, & JV Delgado. 2020. Nonparametric Analysis Of Casein Complex Genes' Epistasis And Their Effects On Phenotypic Expression Of Milk Yield And Composition In Murciano-Granadina Goats. *Journal of Dairy Science*. 103(9) : 8274–8291. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17833>
- Thompson, SJ, CK Hattotuagama, JD Holliday, dan DR Flower. 2006. On The Hydrophobicity Of Peptides: Comparing Empirical Predictions Of Peptide Log P Values. *Bioinformatics*. 1(7) : 237. <https://doi.org/10.6026/97320630001237>



- Vacca, GM, ML Dettori, G Piras, F Manca, P Paschino, dan M Pazzola. 2014. Goat Casein Genotypes Are Associated With Milk Production Traits In The Sarda Breed. *Animal Genetics*. 45(5) : 723–731. <https://doi.org/10.1111/age.12188>
- Widodo, HS, TY Astuti, P Soediartha dan AN Syamsi. 2021. Identification of Goats' and Cows' Milk Protein Profile in Banyumas Regency by Sodium Dodecyl Sulphate Gel Electrophoresis (Sds-Page). *Animal Production*. 23(1) : 27–33. <https://doi.org/10.20884/1.JAP.2021.23.1.37>
- Widodo, HS, TW Murti, A Agus, dan W Widodo. 2019. Mengidentifikasi Peptida Bioaktif Angiotensin Converting Enzyme-inhibitor (ACEi) dari Kasein  $\beta$  Susu Kambing dengan Polimorfismenya Melalui Teknik In Silico. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 7(4) : 180–185. <https://doi.org/10.17728/jatp.3008>