

PENAMBATAN MOLEKULER KURKUMIN DAN ANALOGNYA PADA ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2

Molecular Docking of Curcumin and It's Analogue on Cyclooxygenase-2 Enzyme

Teuku Adelin¹, Frengki², dan Dwinna Aliza³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: teuku_adelin@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengamati interaksi molekuler inhibisi enzim siklooksigenase-2 oleh kurkumin dan beberapa senyawa analognya secara *in silico*. Penelitian ini menggunakan tujuh senyawa obat yaitu kurkumin, analog 1, 2, 3, 4, etodolak, dan asam arakidonat. Senyawa penambatan yang digunakan adalah 1PXX yang didapat dari situs *protein data bank* (PDB). Senyawa agonis yang digunakan adalah asam arakidonat, senyawa antagonis etodolak, sedangkan senyawa ujinya yaitu kurkumin, analog 1, 2, 3, dan 4. Semua senyawa di-*docking* menggunakan aplikasi *ArgusLab 4.0.1*. proses *docking* dilakukan dengan metode *ArgusDock*. Hasil analisis menunjukkan bahwa energi bebas Gibbs (ΔG) kurkumin, analog 2, dan 3 lebih kecil dari pada asam arakidonat. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kurkumin, analog 2, dan 3 mampu menghambat ikatan asam arakidonat.

Kata Kunci: *docking*, siklooksigenase-2, analog kurkumin, *in silico*

ABSTRACT

The objective of this study was to observe molecular interactions between cyclooxygenase-2 inhibition with curcumin and several analogues compounds *In silico*. This study used 7 drug compounds that curcumin, analogue 1, 2, 3, 4, etodolac, and arachidonic acid. The compound docking used was 1PXX obtained from the website of protein data bank (PDB). Agonist compounds used were arachidonic acid, etodolac antagonist compounds, whereas test compound curcumin, analogue 1, 2, 3, and 4. All compounds were docked using *ArgusLab 4.0.1* applications docking process performed by the method of *ArgusDock*. The analysis showed that Gibbs free energy (ΔG) of curcumin, analogue 2 and 3 smaller than arachidonic acid. In conclusion, curcumin, analogue 2, and 3 is able to inhibit the binding of arachidonic acid.

Key words: *docking*, cyclooxygenase-2, analogue of curcumin, *in silico*

PENDAHULUAN

Siklooksigenase (COX) atau prostaglandinedope-oksida sintase (PGHS) merupakan enzim bifungsional yang mula-mula mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin G₂ (PGG₂) melalui dioksigenasi, kemudian mengkatalis peroksidasi PGG₂ menjadi PGH₂. Senyawa PGH₂ adalah prekursor pembentukan beberapa mediator penting untuk nyeri, demam, dan inflamasi. Siklooksigenase bersifat terinduksi dan berada pada jaringan yang inflamasi. Penghambatan enzim COX-2 ini merupakan mekanisme kerja utama dari obat-obat antiinflamasi nonsteroid yang banyak digunakan (Rahmana *et al.*, 2009).

Beberapa tahun terakhir ini perhatian dipusatkan pada metabolit asam arakidonat sebagai mediator inflamasi yang penting. Asam arakidonat berasal dari banyak fosfolipid membran sel yang diaktifkan akibat cedera. Asam arakidonat dapat dimetabolisme dalam dua jalur yang berbeda, jalur siklooksigenase menghasilkan sejumlah prostaglandin dan tromboksan dan jalur lipooksigenase menghasilkan leukotrin.

Kurkuminoid (kurkumin, deme-toksikurkumin dan bisdemetoksi-kurkumin) dalam rhizoma kunyit dan temulawak, selama ini banyak digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat. Berbagai penelitian ilmiah telah banyak dilaporkan tentang aktivitas kurkumin antara lain sebagai antioksidan, anti inflamasi, antibakteri, dan antikanker (Ritmaleni dan Ari Simbara,

2010). Mekanisme kurkumin sebagai antiinflamasi adalah dengan menghambat produksi prostaglandin yang dapat diperantarai melalui penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase (Erlina *et al.*, 2007).

Dalam perkembangannya, modifikasi terhadap senyawa tersebut terus dilakukan untuk memperoleh senyawa yang lebih potensial, stabil, aman, dan memiliki aktivitas yang lebih spesifik (Ritmaleni dan Ari Simbara, 2010). Oleh karena itu, dilakukan penelitian terhadap analog senyawa kurkumin ini dengan tujuan melakukan *virtual screening* kandidat obat yang potensial berdasarkan kemampuan interaksinya (interaksi inhibisi) dengan enzim yang berkaitan dengan aktivitasnya.

Pada penelitian ini, dilakukan pendekatan secara *in silico* terhadap senyawa kurkumin dan analognya. Pendekatan ini dipilih karena memiliki keuntungan tersendiri dibandingkan pendekatan *in vivo* maupun *in vitro*. Keuntungan tersebut antara lain adalah waktu penelitian yang lebih sedikit dan biaya yang jauh lebih murah. Sintesis tradisional dari senyawa obat baru menggunakan kombinasi kimiawi dan *screening* skala besar merupakan proses yang membutuhkan biaya besar dan waktu yang lama, sedangkan *screening database* molekul dari senyawa model dapat dijadikan proses alternatif dalam desain obat (Ekins *et al.*, 2007).

Kandidat obat dari analog kurkumin akan dibandingkan afinitas hasil penambatannya dengan siklooksigenase-2. Diharapkan dari afinitas yang

dievaluasi diperoleh kandidat analog kurkumin yang lebih baik sebagai inhibitor siklooksigenase-2.

MATERI DAN METODE

Pada penelitian ini, kurkumin dan analognya direkonstruksi struktur dua dimensinya menggunakan program *ChemDraw* 2006. Empat buah analog dengan struktur dua dimensinya disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Obat-obat yang memiliki aktivitas menghambat kerja siklooksigenase digunakan sebagai bahan perbandingan kontrol antagonis untuk melihat potensi aktivitas inhibitor siklooksigenase bahan uji. Kontrol agonis adalah substrat asam arakidonat yang berikatan secara normal dengan enzim siklooksigenase, sedangkan sebagai kontrol antagonis digunakan etodolak yang telah terbukti bisa menghambat ikatan asam arakidonat. Struktur dua dimensi obat-obat tersebut dapat diunduh dari *ChemSpider* dengan alamat situs <http://www.chemspider.com>.

Bahan protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur 3 dimensi makromolekul siklooksigenase-2 yang diunduh dari PDB. Digunakan 1PXX (*crystal structure of diclofenac bound to the cyclooxygenase active site of cox-2*).

Metode Penelitian

Pembuatan struktur 3 dimensi kurkumin dan analognya

Struktur 3 dimensi analog yang digunakan dibentuk menggunakan program Chem 3D Ultra. Bentuk ini berdasarkan data 2 dimensi analog yang akan diskriminasi. Setelah dibentuk secara manual, struktur tersebut disimpan sebagai suatu template .pdb. Kemudian struktur tersebut dibuka lewat VegaZZ lalu ditambahkan hidrogen. Mikromolekul kemudian diperbaiki muatannya dengan menambahkan muatan parsial *Gasteiger Charges* dan diberi *forcefield Autodock*. Minimisasi dan pencarian konformasi dilakukan sebanyak 3000 langkah.

Pengunduhan makromolekul target penambatan

Makromolekul diunduh dari situs penyedia PDB makromolekul <http://www.pdb.org>. Kemudian dimasukkan identitas struktur tiga dimensi yang diinginkan untuk diunduh. Data makromolekul disimpan sebagai bentuk .pdb. Untuk penelitian ini, data makromolekul yang diunduh adalah 1PXX.

Validasi metode docking

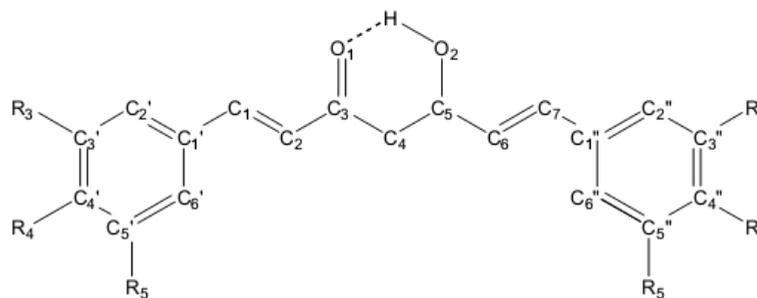
Program *ArgusLab* divalidasi untuk mendapat metode yang dapat dipercaya. Reseptor yang digunakan adalah 1PXX yang didapat dari Protein Data Bank (situs www.rcsb.org/pdb/). Ligan perbandingan di-copy, di-paste dan ligan yang dihasilkan disebut ligan copy. Ligan copy di-docking-kan pada *ligand binding site reseptor* dengan metode *ArgusDoc*. Dilakukan perbandingan nilai ikatan antara ligan perbandingan ligan binding site reseptor dengan ikatan *ligan copy-ligand binding site reseptor*. Analisa data perbandingan nilai dinyatakan dengan RMSD (*Rate Mean Square Deviation*). Metode docking dikatakan baik jika nilai RMSD-nya lebih kecil atau sama dengan 2,5 ($\leq 2,5$). Jika nilai RMSD yang diperoleh lebih besar dari 2,5 ($> 2,5$), metode yang digunakan tidak dapat dipercaya.

Pemisahan rantai makromolekul untuk target penambatan

Struktur tiga dimensi dari siklooksigenase-2 memiliki rantai-rantai. Rantai pada makromolekul tersebut dipisahkan menggunakan aplikasi *UCSF Chimera*. Hasil pemisahan tersebut akan digunakan dalam pengujian superposisi. Makromolekul yang memiliki banyak rantai umumnya tidak dapat disuperposisi secara langsung sehingga dipisahkan terlebih dahulu. Makromolekul juga dipisahkan dari pelarut (air) dan *ligan* atau residu nonstandar menggunakan perangkat lunak yang sama.

Superposisi Rantai

Superposisi rantai dilakukan menggunakan *PyMol*



Gambar 1. Struktur analog kurkumin

Tabel 1. Gugus analog yang digunakan dalam penelitian

No Analog	R3	R4	R5
Analog 1	OCH ₃	OH	OCH ₃
Analog 2	CH ₃	OH	CH ₃
Analog 3	OCH ₃	OCH ₃	H
Analog 4	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

Sumber : Enade *et al.* (2003)

seperti yang dilakukan oleh DeLano (2009). Rantai makromolekul yang telah dipisahkan sebelumnya digunakan sebagai bahan superposisi. Superposisi dilakukan dengan keluaran (*output*) file disimpan dengan menggunakan format .pdb. Rantai dalam satu makromolekul disuperposisi dengan rantai lain dalam makromolekul tersebut. Apabila superposisi antar rantai tersebut menghasilkan struktur yang mirip satu sama lain maka dipilih salah satunya saja sebagai target penambatan.

Optimasi molekul untuk persiapan penambatan

Makromolekul yang sudah disuperposisi kemudian disiapkan untuk penambatan. Makromolekul dioptimasi dengan menggunakan aplikasi VegaZZ. Struktur tiga dimensi dari makromolekul tersebut ditambahkan kembali atom hidrogen. Makromolekul kemudian diperbaiki muatannya dengan menambahkan muatan parsial *Gasteiger Charges* dan diberi *forcefield Autodock*.

Penambatan molekul

Penambatan molekul dilakukan menggunakan program *Arguslab 4.01*. Struktur makromolekul dan ligand yang akan ditambatkan dan telah dioptimasi

secara terpisah disimpan dalam satu folder yang sama. Hasil penambatan disimpan dalam format .pdb. dengan makromolekul.

Evaluasi penilaian (*Scoring*) hasil penambatan

Hasil penambatan divisualisasi menggunakan *PyMOL*. Parameter hasil penambatan dianalisis terhadap parameter penambatan yang telah ditentukan sebelumnya. Energi ikatan *reseptor-ligand* diperoleh melalui program *Arguslab*, melalui *Chimera* dapat diamati residu asam amino yang terdekat dengan *ligand* (< 5 Å), dan jarak dan jenis ikatan *reseptor-ligand* dapat diamati melalui program *PyMOL*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Mikromolekul

Senyawa uji dioptimasi geometri agar diperoleh struktur yang stabil. Optimasi dilakukan menggunakan aplikasi *VegaZZ* seperti yang disajikan Gambar 2.

Validasi Metode *Docking*

Pada proses validasi ini akan dibandingkan antara posisi *ligand* asli 2701DIF terhadap reseptor yang telah

Gambar 2. Hasil optimasi molekul

Senyawa	Struktur 2 Dimensi	Struktur 3 Dimensi (Hasil Optimasi)
Asam Arakidonat		
Etodolak		
Kurkumin		
Analog 1		
Analog 2		
Analog 3		
Analog 4		

diuji secara eksperimental dengan posisi *ligand* yang sama (*ligand copy*), pada kalkulasi sumbu x, y, dan z masing-masingnya: 20,682000 x 23,349147 x 22,409000 Å dan resolusi grid 0,4 Å pada kondisi *ligand* fleksibel. Kondisi *ligand* fleksibel menunjukkan *ligand* memungkinkan untuk melakukan penyesuaian struktur demi mencapai struktur yang stabil saat berikatan dengan reseptor.

Dasar yang digunakan untuk memberikan penilaian adalah nilai RMSD. Metode yang digunakan dikatakan valid jika nilai RMSD yang diperoleh $\leq 2,5$ (Arguslab Tutorial). Berdasarkan hasil validasi *ligand* asli 2701DIF terhadap *ligand copy*, diperoleh nilai RMSD 2,19 pada kondisi *ligand* fleksibel.

Dari hasil validasi didapatkan hasil yang valid, maka parameter docking yang digunakan adalah dalam keadaan *ligand* fleksibel, semakin kecil nilai RMSD maka semakin baik metode yang dilakukan.

Evaluasi Docking

Binding site reseptor diketahui pada residu asam amino Arg 120 yang merupakan *binding site* Asam Arakidonat eksperimental. Parameter yang diamati adalah energi bebas *Gibs* ($-\Delta G$ (kcal/mol) hasil interaksi reseptor-*ligand*, jarak dan residu asam amino yang terdekat dengan *ligand* ($<5 \text{ \AA}$). Hasil *docking* yang dilakukan pada makromolekul 1PXX disajikan pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 diketahui bahwa kurkumin dan *etodolac* mampu menghambat ikatan asam arakidonat terhadap reseptornya, hal itu dibuktikan dari energi ikatan bebas *Gibs* (ΔG) kurkumin dan etodolak lebih kecil dari pada asam arakidonat. Artinya, reseptor siklooksigenase-2 cenderung akan berikatan dengan kurkumin dan etodolak dari pada asam arakidonat yang secara alamiah merupakan substrat bagi reseptor siklooksigenase sendiri. Reseptor siklooksigenase-2 akan lebih stabil berikatan dengan kurkumin dan etodolak dari pada asam arakidonat karena ikatan *ligand-reseptor* yang terjadi melepaskan energi yang lebih besar. Hal ini sejalan dengan laporan Majeed *et al.* (1995) yang menyatakan bahwa kurkumin memiliki daya antiinflamasi dengan cara menghambat ikatan asam arakidonat sehingga produksi prostaglandin sebagai mediator radang dapat dihambat. Menurut Katzung (2012), etodolak sedikit lebih selektif terhadap COX-2 dari pada kebanyakan OAINS lainnya, dengan rasio aktivitas COX-2:COX-1 sekitar 10. Dari berbagai uji klinik pada penderita osteoarthritis ditunjukkan bahwa AINS (anti inflamasi non steroid) baik yang non-selektif maupun selektif menghambat aktivitas COX-2 berkhasiat dalam mengurangi radang dan nyeri rematik (Bensen *et al.*, 1999).

Enzim siklooksigenase-2 mengkatalisis produksi prostaglandin yang berperan dalam proses inflamasi (Kumar *et al.*, 2005). Penghambatan produksi prostaglandin

Tabel 2. Hasil *docking* ligan senyawa uji dengan reseptor siklooksigenase-2

Senyawa	Hasil Docking	
	Energi Ikatan Reseptor-Ligand $-\Delta G$ (kcal/mol)	Residu terdekat ($<5 \text{ \AA}$)
Kurkumin	-10,8923	ALA(527), ARG(120), GLN(350), GLY(526), ILE(92, 112, 345), LEU(93, 117, 352, 359, 531), MET(113, 522), PHE(357, 381, 518), PRO(84, 528), SER(119, 353, 530), TRP(100, 387), TYR(115, 355), VAL(89, 116, 349, 523)
Analog 1	-10.1072	ARG(120, 513), ASN(87)GLU(524), HIS(90), ILE(92,112), LEU(93, 123), MET(113), PHE(357), PRO(84, 86), SER(119), THR(85,88), TRP(100), TYR(115, 122, 355), VAL(89, 116)
Analog 2	-13,3915	ALA(527) ARG(120, 513), ASN(87), GLU(524), GLY(526), HIS(90), ILE(341, 345), LEU(93, 117, 352, 359, 531, 534), LYS(360), MET(113, 535), PHE(357), PRO(84,86), SER(119, 353, 530), THR(85,94), TYR(91, 115, 355), VAL(89, 116, 344, 349)
Analog 3	-11.5358	ARG(120), GLN(369), GLU(524), HIS(90), ILE(92.112), LEU(93, 111, 359), LYS(114), PHE(357), PRO(84), SER(119), THR(118), TRP(100), TYR(115, 355), VAL(89, 116, 523)
Analog 4	-9,86115	ARG(120, 513), GLU(524), HIS(90) ILE(92, 112), LEU(93, 123), LYS(83), MET(113), PHE(357), PRO(84,86), SER(119), THR(85), TRP(100), TYR(115, 355), VAL(89, 116)
Etodolac	-10,7113	ALA(516, 527), ARG(120), GLN(192,350), GLU(524), GLY(354, 526), ILE(517), LEU(352, 384), MET(522), PHE(209, 210, 381, 529, 518, 198), SER(353, 530), THR(206), TRP(387), TYR(355, 385, 348), VAL(349, 523)
Asam Arakidonat	-10,3534	ARG(120, 531), GLU(524), HIS(90), ILE(92, 112), LEU(93, 112, 357), LYS(83), MET(113), PHE(357), PRO(84, 86), PRO(84, 86), SER(119), THR(85,88) TRP(100), TYR(115, 355), VAL(89, 116, 523)

Tabel 3. Ikatan hidrogen senyawa uji dengan asam amino reseptor

Senyawa Uji	Jumlah Ikatan Hidrogen	Jarak Ikatan (Å)	Asam Amino Yang Berikatan	Gugus Senyawa Yang Berikatan
Kurkumin	1	2,62	ARG 120	O-N
Analog 1	3	3,00 3,09	ARG 120	O-N O-N
Analog 2	2	2,58 3,09	HIS 90 PRO 86	O-N O-O
Analog 3	1	2,72	ARG 120	O-N
Analog 4	1	2,68	ARG 120	O-N
Etodolak	1	3,00	ALA 527	O-N
Asam Arakidonat	-	-	-	-

ini terjadi karena ikatan asam arakidonat dengan enzim siklooksigenase lebih lemah dari pada kurkumin dan *etodolak*.

Pada analog kurkumin efek antiinflamasi yang paling kuat dengan energi bebas *Gibs* yang paling kecil terjadi pada analog 2 dan yang energi bebas *Gibs* paling besar terjadi pada analog 4. Analog 2 dan 3 mampu menghambat ikatan asam arakidonat, hal ini terbukti dari energi bebas *Gibs* yang dihasilkan lebih kecil dari pada asam arakidonat, namun pada analog 1 dan 4 energi bebas *Gibs* yang dihasilkan lebih besar dari pada energi bebas *Gibs* asam arakidonat, hal ini menyebabkan analog 1 dan 4 tidak mampu menghambat ikatan asam arakidonat, maka analog 1 dan 4 tidak potensial untuk dijadikan obat antiinflamasi, hal ini disebabkan karena adanya gugus metoksi pada rantai R5 yang menyebabkan senyawa mikromolekul tersebut tidak terlalu stabil untuk berikatan dengan enzim siklooksigenase-2.

Dari residu yang terdekat dengan *ligand* semua menunjukkan interaksi dengan ARG (*arginine*) 120 hal ini menunjukkan bahwa semua *ligand* mampu berinteraksi dengan reseptor asam arakidonat. Data yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa semua senyawa uji (kecuali asam arakidonat) menunjukkan ikatan hidrogen dengan residu asam amino enzim siklooksigenase-2. Namun pada senyawa asam arakidonat tidak ditemui adanya ikatan hidrogen (hal ini kemungkinan disebabkan karena keterbatasan aplikasi yang hanya mampu membaca jenis ikatan ikatan hidrogen) kemungkinan ikatan yang terjadi adalah ikatan *hidrophob* atau *Van Der Wall*.

Fasilitas *docking* ArgusLab menyediakan satu fungsi perhitungan energi bebas ikatan, yaitu Ascore, serta hanya menampilkan interaksi berupa ikatan hidrogen. Nilai akhir energi bebas *Gibs* (Ascore) yang didapat merupakan kontribusi dari ikatan van der waal, hidrofobik, ikatan hidrogen dari atom-atom netral, ikatan hidrogen atom-atom bermuatan, dan jumlah ikatan berotasi. Dengan demikian penentuan afinitas berdasarkan nilai terendah energi bebas ikatan (ΔG)

lebih diutamakan daripada jumlah ikatan hidrogen. Secara eksperimental energi bebas *Gibs* berhubungan langsung dengan konstanta inhibisi, dengan demikian nilai energi bebas *Gibs* dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan suatu senyawa untuk menghambat enzim (Rahmana *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Nilai energi bebas *Gibs* (ΔG) hasil docking menunjukkan bahwa kurkumin, analog 2, dan 3 mempunyai afinitas terhadap reseptor siklooksigenase, sehingga kurkumin, analog 2, dan 3 dapat berperan sebagai obat anti inflamasi. Energi bebas *Gibs* yang paling kecil terdapat pada analog 2, sehingga analog 2 sangat berpotensi untuk dijadikan obat antiinflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bensen, W.G., J.J. Fiechter, and J.I. McMirren. 1999. Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/0560596>.
- Delano, W.L. and S. Bromberg. 2004. PyMOL User's Guide. <http://sourceforge.net/newman/userman/pdf>.
- Ekins, S., J. Mestres, and B. Testa. 2007. *In silico* Pharmacology for Drug Discovery: Application to Targets and Beyond. **British Journal of Pharmacology Review** 152:21-37.
- Erlina, R., I. Atmasari, dan Yanwirasti. 2007. Efek anti inflamasi ekstrak etanol kunyit (*curcuma domestika val.*) pada tikus putih jantan galur wistar. **Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi** 2(12):112-115.
- Estyastono, E.P., S. Martono, H.D. Pranowo, dan I. Tahir. 2003. Analisis hubungan kuantitatif struktur-aktivitas kurkumin dan turnannya sebagai unhibitor GST berdasarkan perhitungan kimia komputasi. **Indonesian Journal of Chemistry** 3(3):179-186.
- Katzung, B.G. 2012. **Farmakologi Dasar dan Klinik**, Edisi ke-10. EGC, Jakarta.
- Kumar, V., A.K. Abbas, and N. Fausto. 2005. Acute and Chronic Inflammation. In **Pathologic Basis of Disease**. 7th ed., Philadelphia.
- Majeed M., V. Badmaev, U. Shivakumar, and R. Rajendran. 1995. **Curcuminoids Antioxidant**. Photonutrients, Nutriscience Publisher, Piscataway, New Jersey.
- Rahmana, E.K., H. Rina, H. Nuriani, dan G. Tutus. 2009. Docking turunan kuersetin berdasarkan studi interaksi flavonoid terhadap enzim siklooksigenase. **Indo. J. Chem.** 9(2):297-302.
- Ritmaleni dan S. Ari. 2010. Sintesis tetrahidro pentagamavunon-0. **Majalah Farmasi Indonesia** 21(2):100-105.