

PERBANDINGAN AFINITAS KURKUMIN-ENOL DAN KURKUMIN-KETO TERHADAP COX-2

Mohammad Rizki Fadhil Pratama

Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangkaraya

Email : m.rizkifadhil@umpalangkaraya.ac.id

ABSTRAK

Kurkumin selain dikenal memiliki aktivitas sebagai hepatoprotektor juga diketahui memiliki aktivitas sebagai analgetik. Aktivitas analgetik kurkumin dihubungkan dengan potensi sebagai inhibitor jalur metabolisme asam arakidonat. Salah satu komponen penting pada jalur asam arakidonat adalah enzim siklooksigenase (COX), dimana inhibisi pada COX-2 diketahui memiliki efek lebih signifikan terhadap aktivitas analgetik suatu senyawa. Kurkumin merupakan rasemat dengan dua bentuk aktif yaitu bentuk – enol dan –keto. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan afinitas masing-masing bentuk aktif kurkumin terhadap COX-2. Metode yang digunakan adalah *docking* dengan kurkumin-keto memberikan energi bebas ikatan paling negatif dan konstanta inhibisi paling kecil, secara berturut-turut yaitu -8,45 kcal/mol dan 642,19 nM. Bentuk –keto pada kurkumin memberikan afinitas hampir 2 kali lipat lebih tinggi dibandingkan bentuk – enol pada kurkumin. Hasil tersebut memberikan prediksi bahwa untuk meningkatkan aktivitas analgetik kurkumin sebagai inhibitor COX-2 dapat dilakukan dengan meningkatkan perbandingan bentuk –keto dari kurkumin.

Kata Kunci: COX-2, *Docking*, Kurkumin-enol, Kurkumin-keto

PENDAHULUAN

Berbagai penelitian telah menunjukkan aktivitas luas dari senyawa kurkumin, diantaranya sebagai antikanker (Ye *et al.*, 2012; Soung & Chung, 2011; Zhang *et al.*, 1999), antiinflamasi (Teiten *et al.*, 2010; Shanmugam *et al.*, 2015), antioksidan, antiviral, antibakteri, antifungi (Aggarwal *et al.*, 2007) dan analgetik (Goel *et al.*, 2001). Terkait aktivitas analgetik dari kurkumin, beberapa menunjukkan bahwa aktivitas analgetik kurkumin dikaitkan dengan kemampuannya untuk menginhibisi enzim siklooksigenase. Siklooksigenase

(COX) sendiri merupakan enzim yang diproduksi oleh sel tubuh dan bertanggung jawab dalam pembentukan prostaglandin, salah satu mediator yang dilepaskan tubuh pada saat terjadi inflamasi dan nyeri (Shanmugam *et al.*, 2015). Inhibisi pada COX akan menghambat pembentukan prostaglandin dan secara langsung akan menghambat pembentukan respon nyeri pada tubuh (Zhang *et al.*, 1999).

Dalam tubuh terdapat 2 jenis enzim COX, yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 banyak terdapat pada sel epitel lambung. Inhibisi pada COX-1 akan mengganggu keseimbangan produksi

asam lambung (Goel *et al.*, 2001). COX-2 diproduksi tubuh pada saat sel mengalami cedera fisiologis sebagai respon alami tubuh. Inhibisi pada COX-2 akan menghambat produksi mediator nyeri seperti prostaglandin, dan secara efektif menghambat respon nyeri oleh tubuh (Zhang *et al.*, 1999). Inhibisi spesifik pada COX-2 pada terapi nyeri umumnya lebih dipilih karena relatif tidak menimbulkan efek samping peningkatan produksi asam lambung seperti yang sering terjadi pada pemberian AINS non-spesifik (Teiten *et al.*, 2010).

Kurkumin diketahui memiliki efek analgetik yang lebih selektif pada inhibisi COX-2 dibandingkan COX-1 (Zhang *et al.*, 1999). Namun kurkumin sendiri bukanlah suatu senyawa tunggal, melainkan terdiri dari dua buah bentuk yaitu kurkumin-enol dan kurkumin keto (Akram *et al.*, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dari kedua jenis kurkumin tersebut yang memiliki afinitas paling tinggi sebagai inhibitor COX-2.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian

Penelitian dilaksanakan secara *in silico* dengan metode *molecular docking*. Perangkat keras yang digunakan adalah Ultrabook ASUS seri A46CB dengan prosessor Intel core i5-3337U@1,8GHz

dan sistem operasi windows 7 Ultimate 64-bit SP-1.

Preparasi ligan

Ligan yang digunakan adalah kurkumin-enol dan kurkumin-keto. Struktur ligan diskesta menggunakan software GaussView 3.08 dan dioptimasi geometri dengan menggunakan Gaussian 03W dari Gaussian, Inc. dengan metode *ab initio* Hartree-Fock basis set 3-21G. Optimasi geometri dilakukan untuk memperoleh konformasi paling ideal dari struktur senyawa yang disketsa dan mendekati bentuk alaminya (Cosconati *et al.*, 2010).

Konversi ligan

Ligan yang telah dioptimasi dikonversi dari format .log menjadi format .pdb menggunakan software OpenBabel 2.3.2 (O'Boyle *et al.*, 2011). Ligan lalu diberi muatan dan diatur torsinya menggunakan software AutoDockTools 1.5.6.rc3 (Morris *et al.*, 2009).

Preparasi reseptor

Reseptor yang digunakan adalah reseptor COX-2(PDB ID 5IKR).Struktur molekul reseptor diperoleh website Protein Data Bank (PDB) www.rcsb.org. Reseptor diunduh dalam format .pdb kemudian dihilangkan bagian yang tidak digunakan, ditambahkan hidrogen non-polar, diberi muatan, serta diatur posisi

grid box menggunakan software AutoDockTools 1.5.6.rc3 (Morris *et al.*, 2009).

Validasi reseptor

Reseptor yang akan digunakan divalidasi terlebih dahulu. Metode yang digunakan adalah *redocking* dengan ligan ko-kristal dari reseptor digunakan sebagai ligan uji. Pada reseptor COX-2 5IKR sebagai ligan ko-kristal adalah asam mefenamat. Selanjutnya, asam mefenamat digunakan sebagai ligan uji dengan koordinat dan ukuran *grid box* disesuaikan dengan posisi ligan hasil kristalografi. Parameter pengamatan pada proses validasi adalah RMSD yang menggambarkan rata-rata selisih posisi atom hasil *redocking* dengan hasil kristalografi. Software *docking* cenderung menunjukkan hasil yang sama dengan hasil kristalografi jika memberikan nilai RMSD kurang dari 2Å. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan posisi ligan hasil *docking* dengan posisi ligan hasil kristalografi (Bissantz *et al.*, 2000).

Molecular docking

Program *docking* yang digunakan dalam penelitian ini adalah Autodock 4.2.3 dari The Scripps Research Institute, Inc. (Morris *et al.*, 2009). Metode yang digunakan adalah *pose selection* yaitu dengan melakukan *docking* pada bagian kantung aktif reseptor yang berikatan

dengan ligan pada reseptor hasil kristalografi yaitu asam mefenamat (Kontoyianni *et al.*, 2004).

Parameter pengamatan

Parameter yang diamati untuk penentuan afinitas ligan terhadap reseptor adalah energi bebas ikatan (ΔG), konstanta inhibisi prediksi (k_i), residu asam amino, serta ikatan hidrogen. Afinitas ligan terhadap reseptor ditentukan oleh nilai ΔG dan k_i . Semakin negatif nilai ΔG dan semakin kecil nilai k_i menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi (Kim & Skolnick, 2007). Ligan uji dengan residu asam amino dan ikatan hidrogen yang mendekati ligan alami menunjukkan kemiripan jenis interaksi dalam hal ini menggambarkan kemiripan aktivitas (Cosconati *et al.*, 2010).

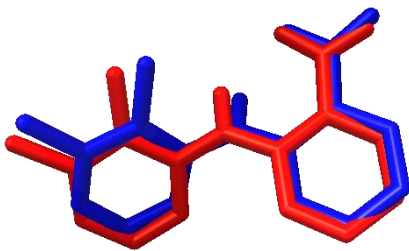
HASIL DAN PEMBAHASAN

Masing-masing ligan uji disketsa dan dioptimasi geometri menggunakan metode Hartree-Fock dengan basis set 3-21G. Metode tersebut merupakan pendekatan *ab initio* dengan tingkat kepercayaan yang relatif tinggi untuk pengerjaan secara *in silico* (Cosconati *et al.*, 2010). Struktur 2 dimensi dan 3 dimensi dari seluruh ligan yang digunakan ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Struktur 3D Kurkumin-enol dan Kurkumin-keto

Senyawa	Struktur 2D	Struktur 3D
Kurkumin-enol (KEN)		
Kurkumin-keto (KKT)		

Validasi reseptor untuk menentukan ukuran *grid box* dilakukan dengan metode *redocking*. Koordinat *grid box* disesuaikan dengan ukuran *grid box*. Nilai ΔG dan K_i tersebut beserta residu asam amino dan ikatan hidrogen lalu digunakan sebagai data pembandingan dari hasil *docking*. *Overlay* ligan hasil *redocking* dengan ligan hasil kristalografi ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Overlay posisi ligan hasil *redocking* dengan ligan hasil kristalografi

(Ket: biru = ligan hasil *redocking*; merah = ligan hasil kristalografi)

Nilai RMSD dari hasil validasi adalah sebesar 0,575Å. Nilai tersebut menunjukkan posisi ligan hasil *redocking* yang sangat mendekati hasil kristalografi. Parameter pengamatan hasil *redocking* ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil validasi reseptor COX-2 5IKR dengan metode *redocking*

Reseptor	5IKR
RMSD (Å)	0,575
ΔG (kcal/mol)	-7,68
K_i (µM)	2,35
Residu Asam Amino	349-Val 352-Leu 385-Tyr 387-Trp 526-Gly 527-Ala 530-Ser 531-Leu
Ikatan Hidrogen	2
Koordinat <i>grid box</i>	x : 38,042 y : 2,131 z : 61,28
Ukuran <i>grid box</i> (Å)	40 x 40 x 40

Koordinat dan ukuran *grid box* yang telah diperoleh lalu digunakan untuk proses *docking* masing-masing ligan. Selanjutnya masing-masing ligan uji dilakukan *docking* terhadap reseptor 5IKR. Hasil *docking* terhadap reseptor COX-2 ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil *docking* kurkumin-enol dan kurkumin-keto pada reseptor COX-2

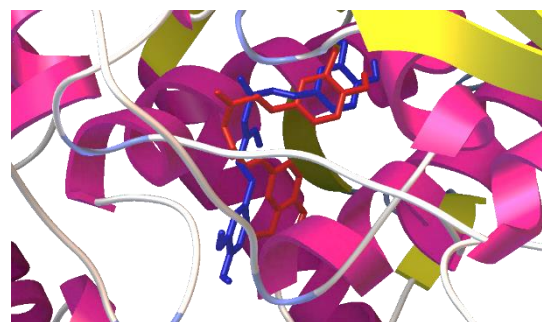
Ligan	KEN	KKT
ΔG (kcal/mol)	-8,08	-8,45
K_i (µM)	1,2	0,64219
Residu Asam Amino	90-His	-
	-	120-Arg
	205-Phe	205-Phe
	209-Phe	-
	344-Val	344-Val
	348-Tyr	348-Tyr
	349-Val	349-Val
	352-Leu	352-Leu
	353-Ser	-
	355-Tyr	355-Tyr
	381-Phe	381-Phe
	384-Leu	384-Leu
385-Tyr	385-Tyr	

	387-Trp	387-Trp
	518-Phe	-
	-	522-Met
	523-Val	523-Val
	526-Gly	526-Gly
	527-Ala	527-Ala
	530-Ser	530-Ser
	-	531-Leu
	534-Leu	-
Ikatan Hidrogen	1	0

(Ket: warna hijau menunjukkan kesamaan dan kuning menunjukkan perbedaan dengan hasil *redocking*)

Hasil *docking* terhadap reseptor COX-2 menunjukkan perbedaan afinitas yang tidak terlalu jauh, dimana kurkumin-keto menunjukkan afinitas nyaris 2 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kurkumin-enol dan 4 kali lipat lebih tinggi dibandingkan asam mefenamat sebagai pembanding. Kurkumin-keto dan kurkumin-enol secara berturut-turut memberikan 8 dan 7 residu asam amino yang sama dengan yang ditunjukkan pada hasil validasi (tabel 3). Disisi lain kurkumin-keto menunjukkan 9 residu asam amino yang berbeda dengan hasil validasi, berbanding dengan 12 residu asam amino pada kurkumin-enol. Kurkumin-keto tidak memberikan ikatan hidrogen, dimana kurkumin-enol memberikan 1 ikatan hidrogen. Adanya ikatan hidrogen seharusnya memberikan tambahan afinitas pada ligan, namun hal tersebut tidak terjadi pada kurkumin-keto. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat interaksi pada residu asam amino tertentu yang memberikan afinitas tinggi pada kurkumin-keto. Pada

tabel 3 dapat dilihat terdapat 8 asam amino yang berbeda antara hasil *docking* kurkumin-enol dan kurkumin-keto. Perbedaan asam amino tersebut terletak pada posisi yang relatif dekat, kecuali pada posisi 90-His untuk kurkumin-enol dan 120-Arg untuk kurkumin-keto yang berada pada posisi relatif berjauhan. Hal tersebut menunjukkan bahwa asam amino tersebut menjadi asam amino kunci pada masing-masing interaksi. Perbandingan visual antara posisi ligan hasil *docking* ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Perbandingan hasil *docking* antara kurkumin-enol dan kurkumin-keto terhadap reseptor COX-2

(Ket: biru = kurkumin-enol; merah = kurkumin-keto)

Pada gambar 2 dapat diamati posisi gugus keto pada kurkumin-keto (warna merah gambar 2) membentuk suatu sudut yang dipengaruhi oleh adanya elektron bebas pada gugus karbonil, sehingga menimbulkan gaya tolak-menolak pada masing-masing atom O dari gugus karbonil. Hal tersebut mengakibatkan terbentuknya struktur kurkumin yang cenderung melipat dan berpotensi untuk berinteraksi dengan

asam amino yang lebih banyak pada posisi yang lebih dalam dari kantung aktif COX-2. Sebaliknya pada kurkumin-enol (warna biru gambar 2) keberadaan gugus hidroksoil dan karbonil yang bersebelahan justru memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen pada masing-masing gugus yang menyebabkan struktur kurkumin menjadi lebih linear. Struktur kurkumin-enol tersebut meskipun memungkinkan untuk berada pada kantung aktif COX-2 namun tidak memberikan interaksi sebanyak pada kurkumin-keto.

KESIMPULAN

Kurkumin-keto memberikan potensi yang lebih besar sebagai analgetik inhibitor COX-2 dibandingkan kurkumin-enol. Asam amino arginin pada posisi 120 diprediksi memberikan pengaruh signifikan terhadap afinitas kurkumin-keto pada COX-2. Posisi gugus keto yang membentuk sudut memberikan kesesuaian sterik dengan kontur kantung aktif COX-2. Eksplorasi pada sekitar posisi asam amino 120 diprediksi dapat mengoptimalkan afinitas kurkumin-keto terhadap COX-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Rektor Universitas Muhammadiyah Palangkaraya Dr. Bulkani, M.Pd. yang telah memberikan bantuan pendanaan

dalam rangka terlaksanakannya penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- Aggarwal, B.B., Y.J.Surh, S.Shishodia. 2007. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. Springer Science Business Media, LLC. New York, USA.
- Akram, M., Shahab-uddin, A.Ahmed, K.Usmanghani, A.Hannan, E.Mohiuddin, M.Asif. 2010. Curcuma longa and Curcumin : A Review Article. *Romanian Journal of Biology – Plant Biology*. Vol. 55. No. 2. 65-70.
- Baskaran, C. & M.Ramachandran. 2012. Computational Molecular Docking Studies on Anticancer Drugs. *Asian pacific Journal of Tropical Disease*. S734-S738.
- Bissantz, C., G.Folkers, D.Rognan. 2000. Protein-based Virtual Screening of Chemical Databases : Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol 43. 4759-4767.
- Cosconati, S., S.Forli, A.L.Perryman, R.Harris, D.S.Goodsell, A.J.Olson. 2010. Virtual Screening with AutoDock : Theory and Practice. *Expert Opinion Drug Discovery*. Vol 5. No 6. 597-607.
- Goel, A., C.R.Boland, D.P.Chauhan. 2001. Specific Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression by Dietary Curcumin in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Letters*. Vol. 172. 111-118.
- Kim, R. & J.Skolnick. 2007. Assesment of Programs for Ligand Binding Affinity Prediction. *Journal of Computational Chemistry*. 1-15.
- Kontoyianni, M., McClellan, Sokol. 2004. Evaluation of Docking Performance : Comparative Data on Docking Algorithm. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol 47. 558-565.
- Morris, G. M., R.Huey, W.Lindstrom, M.F.Sanner, R.K.Belew, D.S.Goodsell, A.J.Olson. 2009.

- Autodock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. Vol 16. 2785-2791.
- O'Boyle, N., M.Banck, C.A.James, C.Morley, T.Vandermeersch, G.R.Hutchison. 2011. Open Babel : AN Open Chemical Toolbox. *Journal of Chemoinformatics*. Vol 3. No. 33.
- Shanmugam, M.K., G.Rane, M.M.Kanchi, F.Arduino, A.Chinnathambi, M.E.Zayed, S.A.Alharbi, B.K.H.Tan, A.P.Kumar, G.Sethi. 2015. Review : The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*. Vol. 20. 2728-2769.
- Soung, Y.W., J.Chung. 2011. Curcumin Inhibition of the Functional Interaction Between Integrin $\alpha 6\beta 4$ and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Molecular Cancer Therapeutics*. Vol. 10. No. 5. 883-891.
- Teiten, M.H., S.Eifes, M.Dicato, M.Diederich. 2010. Review : Curcumin – The Paradigm of a Multi-Target Natural Compound with Applications in Cancer Prevention and Treatment. *Toxins*. Vol. 2. 128-162.
- Ye, M.X., Y.Li, H.Yin, J.Zhang. 2012. Review : Curcumin updated Molecular Mechanisms and Interventions Targets in Human Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 13. 3959-3978.
- Zhang, F., N.K.Altorki, J.R.Mestre, K.Subbaramaiah, A.J.Dannenbergh. 1999. Curcumin Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription in Bile Acid- and Phorbol Ester-Treated Human Gastrointestinal Epithelial Cells. *Carcinogenesis*. Vol. 20. No. 3. 445-451.