



Pencarian Inhibitor DYRK2 dari Database Bahan Alam Zinc15: Analisis Farmakofor, Simulasi Docking dan Dinamika Molekuler

(Searching of DYRK2 inhibitors from zinc15 natural product database: pharmacophore analysis, docking and molecular dynamics simulation)

La Ode Aman^{*1}, Mangara Sihaloho¹, & Arfan²

¹Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Gorontalo, Kota Gorontalo, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari, Indonesia

ABSTRACT: DYRK2 is a protein kinase that has many roles in various biological processes, including division, proliferation, differentiation, and apoptosis of cell. DYRK2 is involved in cell cycle regulation by regulating the activity of the 26S proteasome so that inhibition of DYRK2 activity can inhibit the function of the 26S proteasome and reduce the proliferation of cancer cells. In vitro test, Curcumin reduces the proliferation of cancer cells through inhibition of the DYRK2 enzyme. In the present work, curcumin analogues have been screened from the Zinc15 natural product database using a ligand-based pharmacophore model approach. The result was then evaluated by molecular docking and dynamics based on interaction energy, the average of binding free energy and interaction stability between ligand and active site of DYRK2. Screening of 270.547 molecules from Zinc15 database yielded 110 selected hit compounds. Molecular docking and dynamics consider three prospective curcumin analogues i.e. ZINC000085597244, ZINC000217945958, and ZINC000217643970. These molecules have better criteria than curcumin in some criteria, such as interaction energy, free binding energy, and interaction stability with the target. In conclusion, ZINC000085597244, ZINC000217945958, and ZINC000217643970 compounds are predicted to be potential candidates for anticancer drugs with a specific mechanism of action against DYRK2.

Keywords: curcumin analogues; DYRK2; pharmacophores; molecular docking; molecular dynamics.

ABSTRAK: DYRK2 (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2) merupakan protein kinase yang memiliki banyak peranan dalam berbagai proses biologis, termasuk pembelahan sel, proliferasi sel, diferensiasi sel, dan apoptosis. DYRK2 diantaranya terlibat dalam regulasi siklus sel dengan cara mengatur aktivitas proteasom 26S sehingga inhibisi aktivitas DYRK2 dapat menghambat fungsi proteasom 26S dan mengurangi proliferasi sel kanker. Secara in vitro, kurkumin menunjukkan kemampuan mengurangi proliferasi sel kanker melalui penghambatan enzim DYRK2. Pada penelitian ini, analog kurkumin telah diskrining dari database bahan alam Zinc15 dengan menggunakan model farmakofor yang diperoleh dengan pendekatan berbasis ligan. Hasil skrining kemudian dievaluasi dengan menerapkan teknik docking molekuler dan dinamika molekuler berdasarkan energi interaksi, rata-rata energi pengikatan bebas dan stabilitas interaksi antara ligan dan situs aktif DYRK2. Skrining terhadap 270.547 molekul dari database bahan alam Zinc15 menghasilkan 110 senyawa hit terpilih. Dengan mempertimbangkan hasil simulasi docking dan dinamika molekuler, tiga analog kurkumin prospektif telah dipilih yaitu ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970. Molekul-molekul ini memiliki kriteria yang lebih baik dibandingkan kurkumin pada beberapa kriteria, seperti energi interaksi, energi pengikatan bebas, dan stabilitas interaksi dengan target. Disimpulkan, senyawa-senyawa ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970 diprediksi sebagai kandidat potensial untuk obat anti-kanker dengan mekanisme aksi spesifik terhadap DYRK2.

Kata kunci: analog kurkumin; DYRK2; farmakofor; docking molekuler; dinamika molekuler.

Pendahuluan

Banyak penelitian telah dilaporkan tentang efek antikanker kurkumin, turunan atau analog kurkumin. Aktivitas antikanker kurkumin bertindak dengan menginduksi apoptosis, menghambat proliferasi dan invasi tumor dengan menekan berbagai jalur sinyal seluler [1-3]. Metabolit sekunder rimpang kunyit (*Curcuma longa*) ini juga memiliki mekanisme sebagai antitumor dengan

mengganggu jalur seluler yang berbeda dan menginduksi produksi berbagai jenis sitokin, enzim atau faktor pertumbuhan seperti MAPK, EGF, NFκB, PKD1, COX-2, STAT3, TNF-α, dan IκBβ [4], serta dengan menghambat dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 (DYRK2) yang merupakan regulator positif

Article history

Received: 09 April 2023

Accepted: 13 April 2023

Published: 30 April 2023

Access this article



***Corresponding Author:** La Ode Aman

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Jend. Sudirman No.6, Kota Gorontalo, Gorontalo 96128 | Email: laode_aman@ung.ac.id

proteasom 26S [4]. Beberapa penelitian melaporkan aktivitas antitumor kurkumin pada kanker payudara, kanker paru-paru, karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, kanker prostat, dan tumor otak, kemampuan kurkumin menargetkan berbagai jenis cell line kanker [3]. Beberapa penemuan senyawa baru yang merupakan turunan atau analog kurkumin yang memiliki farmakokinetik lebih baik daripada kurkumin, seperti meningkatkan kelarutan, stabilitas dalam air, memperlambat metabolisme dan akumulasi selektif pada pankreas dan jaringan prostat, menunjukkan bahwa ada selektivitas pada jenis kanker tertentu dan bahkan memberikan khasiat antikanker yang lebih baik daripada kurkumin [3,5].

Penelitian senyawa turunan atau analog kurkumin masih menjadi pekerjaan yang menantang dan prospektif saat ini dalam rangka menemukan kandidat obat antikanker baik berupa senyawa baru maupun senyawa yang sudah ada. Studi farmakofor analog kurkumin yang berguna untuk skrining virtual berbasis ligan menggunakan 24 senyawa (analog kurkumin dan kurkumin) yang telah dilaporkan oleh Artico et al sebagai set aktif belum pernah dilakukan [6]. Selain itu, kurkumin telah terbukti secara *in vitro* mampu menghambat DYRK2 secara selektif. Namun, belum dilaporkan analog kurkumin yang dipelajari sebagai agen antikanker potensial melalui penghambatan DYRK2 [4].

Salah satu pendekatan yang digunakan dalam mencari senyawa kandidat obat dan mempelajari potensi farmakologisnya adalah penerapan kimia komputasi, yang meliputi studi farmakofor, skrining virtual, docking, dan dinamika molekul. Studi farmakofor berarti mempelajari faktor sterik dan elektronik yang dimiliki oleh senyawa obat yang berperan dalam interaksi molekuler dengan struktur target biologis tertentu. Model farmakofor hipotetis dapat diproduksi dalam dua pendekatan yaitu berbasis ligan dan berbasis struktur protein. Virtual screening berarti proses penyaringan bank data dengan menerapkan kriteria atau parameter tertentu sehingga dipilih bagian dari daftar senyawa dari database. Untuk mendapatkan sejumlah kecil senyawa pilihan, biasanya proses virtual screening dilanjutkan dengan aplikasi docking dan dinamika molekul.

Keuntungan dari pendekatan ini sebagai studi pendahuluan dalam menyaring dan mempelajari potensi farmakologis suatu senyawa adalah penghematan dalam hal biaya dan waktu. Ribuan atau bahkan jutaan senyawa tidak perlu diuji *secara in vivo* atau *in vitro* untuk memilih senyawa potensial terbaik. Skrining virtual analog kurkumin berdasarkan model farmakofor akan mengantarkan sejumlah kecil analog kurkumin yang memiliki kesamaan farmakofor dengan kurkumin. Docking dan dinamika

molekuler akan mengarah pada seleksi lanjutan senyawa yang memiliki farmakofor serupa sehingga jumlah senyawa terpilih yang jauh lebih kecil diperoleh setelah mengetahui pola energi dan interaksi dengan molekul target.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan senyawa analog kurkumin yang diprediksi memiliki sifat antikanker dengan mekanisme penghambatan spesifik kerja DYRK2. Langkah-langkah yang dilakukan untuk mencapai tujuan tersebut adalah dengan melakukan skrining virtual terhadap database senyawa bahan alam yang disediakan oleh Zinc15 dengan pendekatan kesamaan farmakofor dengan analog kurkumin dan kurkumin yang telah diketahui aktivitasnya sebagai antikanker. Daftar senyawa yang dihasilkan dari skrining virtual kemudian dipilih kembali dengan menerapkan metode docking dan dinamika molekul. Senyawa terpilih adalah senyawa yang memberikan parameter terbaik dalam hal energi interaksi, energi bebas ikat rata-rata, dan stabilitas interaksi dengan molekul target [7].

Metode Penelitian

Penyiapan Senyawa Aktif dan Decoy

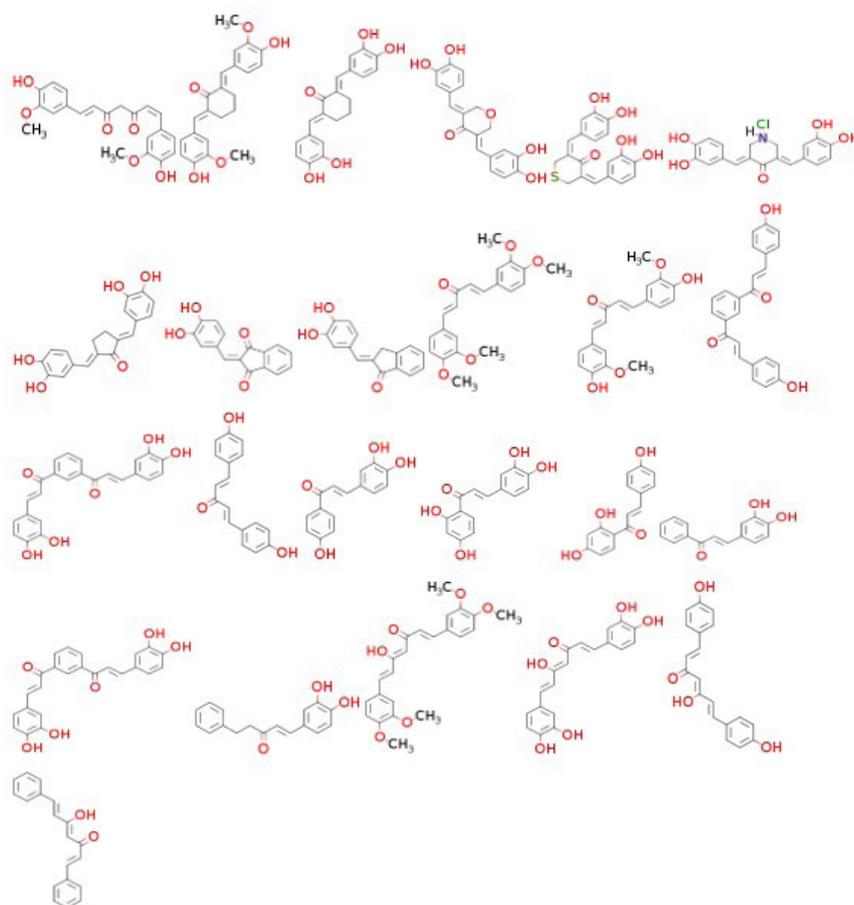
Struktur molekul senyawa aktif berjumlah 24 senyawa yang terdiri dari analog kurkumin dan kurkumin yang digunakan dalam pemodelan farmakofor, ditunjukkan pada [Gambar 1](#). Senyawa decoy dihasilkan menggunakan Decoy Finder 2.0. Struktur tiga dimensi senyawa aktif dan decoy disimpan dalam format mol2 [6,8].

Penyiapan Protein

Protein target yang digunakan dalam penelitian ini adalah DYRK2 yang diperoleh dari protein bank data server web RCSB [9] dengan PDB ID 5ZTN [4]. Struktur kristal protein berada dalam kompleksnya dengan kurkumin, yang merupakan penghambat DYRK2. Tindakan penyiapan protein termasuk menghilangkan molekul air, atom dan molekul lain, memilih salah satu rantai, dan memisahkan struktur protein dan ligan asli menggunakan Biovia Discovery Studio [10]. Perbaikan residu putus pada struktur protein dilakukan dengan menggunakan modul MODELLER [11] yang terintegrasi pada UCSF Chimera [12]. Perbaikan atom, penambahan atom hidrogen, dan muatan dari protein dikerjakan menggunakan AutoDockTools 1.5.6 [13].

Analisis Farmakofor

Analisis farmakofor meliputi deteksi, *generate*, dan validasi model farmakofor yang dilakukan dengan menggunakan PharmaGist [14]. Deteksi farmakofor



Gambar 1. Kurkumin dan analog kurkumin sebagai senyawa aktif

dilakukan pada molekul kurkumin, sedangkan model farmakofor dihasilkan dari senyawa aktif ([Gambar 1](#)), di mana kurkumin dipilih sebagai molekul kunci (pivot). Validasi model farmakofor dilakukan dengan menggunakan aplikasi Screening Explorer [\[15\]](#) untuk mendeteksi model terbaik dengan kriteria nilai AUC ROC lebih dari 0,5.

Database Penyaringan

Senyawa bahan alam sebanyak 270.547 senyawa yang disediakan oleh Zinc15 [\[7\]](#) dipilih sebagai database. Penyaringan senyawa database dilakukan dengan menggunakan PharmaGist dengan pendekatan model farmakofor berbasis ligan yaitu dengan menggunakan model farmakofor terbaik yang diperoleh dari tahap analisis farmakofor. Hasil penyaringan basis data ditetapkan sebagai senyawa terpilih langkah 1 (STL1).

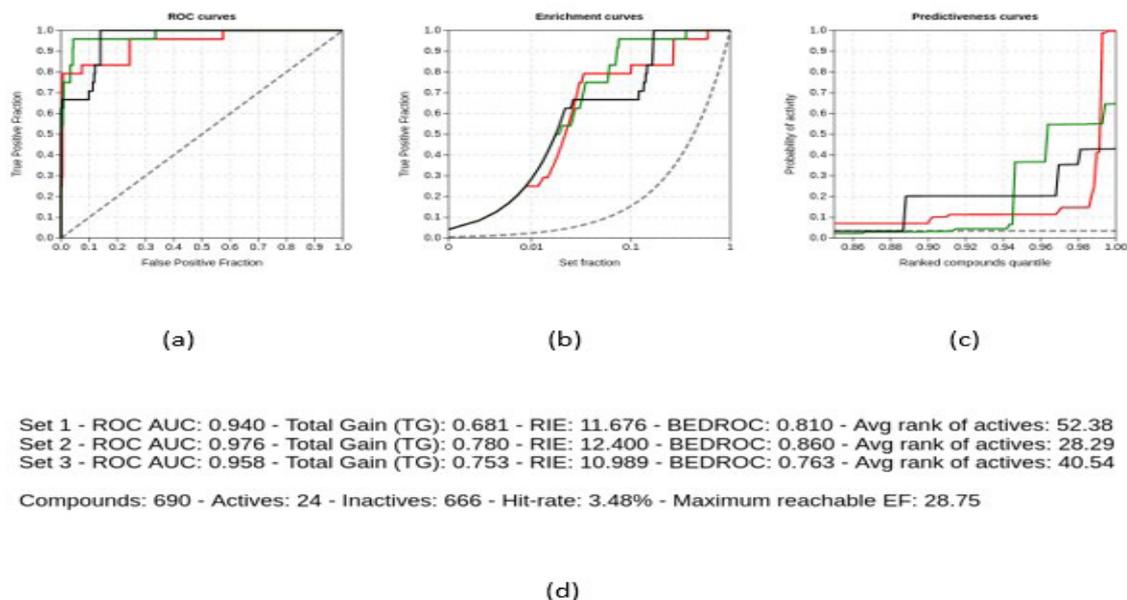
Molecular Docking

Proses *screening* dilanjutkan dengan menerapkan simulasi docking molekuler menggunakan paket program Autodock4 [\[16\]](#). Semua senyawa pada STL1 ditambatkan

pada sisi aktif DYRK2 yang tervalidasi. Protokol *redocking* ligan alami adalah alat yang digunakan untuk evaluasi sisi aktif DYRK2 dimana sisi aktif dianggap valid jika hasil redocking ligan alami menunjukkan nilai RMSD (root mean square distance) $< 2 \text{ \AA}$. Protokol docking dilakukan dengan menggunakan kriteria: protein kaku, parameter algoritma genetika dengan GA RUN = 20, jumlah evaluasi maksimum = 25000000 pada jumlah ikatan yang dapat diputar. Berdasarkan energi interaksi ligan alami dan STL1 yang dihitung dengan pendekatan docking molekuler sehingga diperoleh senyawa terpilih langkah 2 (STL2) dengan energi interaksi tertinggi dibandingkan ligan uji lainnya.

Molecular Dynamics

Simulasi dinamika molekuler digunakan untuk mencari tahu bagaimana kestabilan interaksi dari STL2 dengan DYRK2. Penilaian kestabilan interaksi ligan uji juga dibandingkan dengan kestabilan interaksi ligan alami dengan DYRK2. Simulasi dinamika molekuler dikerjakan dengan menggunakan paket program GROMACS 2022 [\[17,18\]](#).



Gambar 2. Kurva ROC (a), Kurva enrichment (b) dan Kurva predictiveness (c) dari model farmakofor 1.pha (merah), set 2.pha (hijau) dan 3.pha (hitam). Perhitungan global metrics ditunjukkan pada (d)

Topologi protein disiapkan menggunakan AMBER99SB-ILDN yang dihasilkan oleh Gromacs 2021.3, dan topologi ligan disiapkan menggunakan General AMBER Force Field (GAFF) [19] dihasilkan menggunakan paket program Antechamber dari Am bertools 2021 [20] dengan bantuan Acyppe [21]. Dalam simulasi MD, konformasi awal adalah kompleks protein-ligan yang berasal dari simulasi docking molekul dengan energi ikatan terendah.

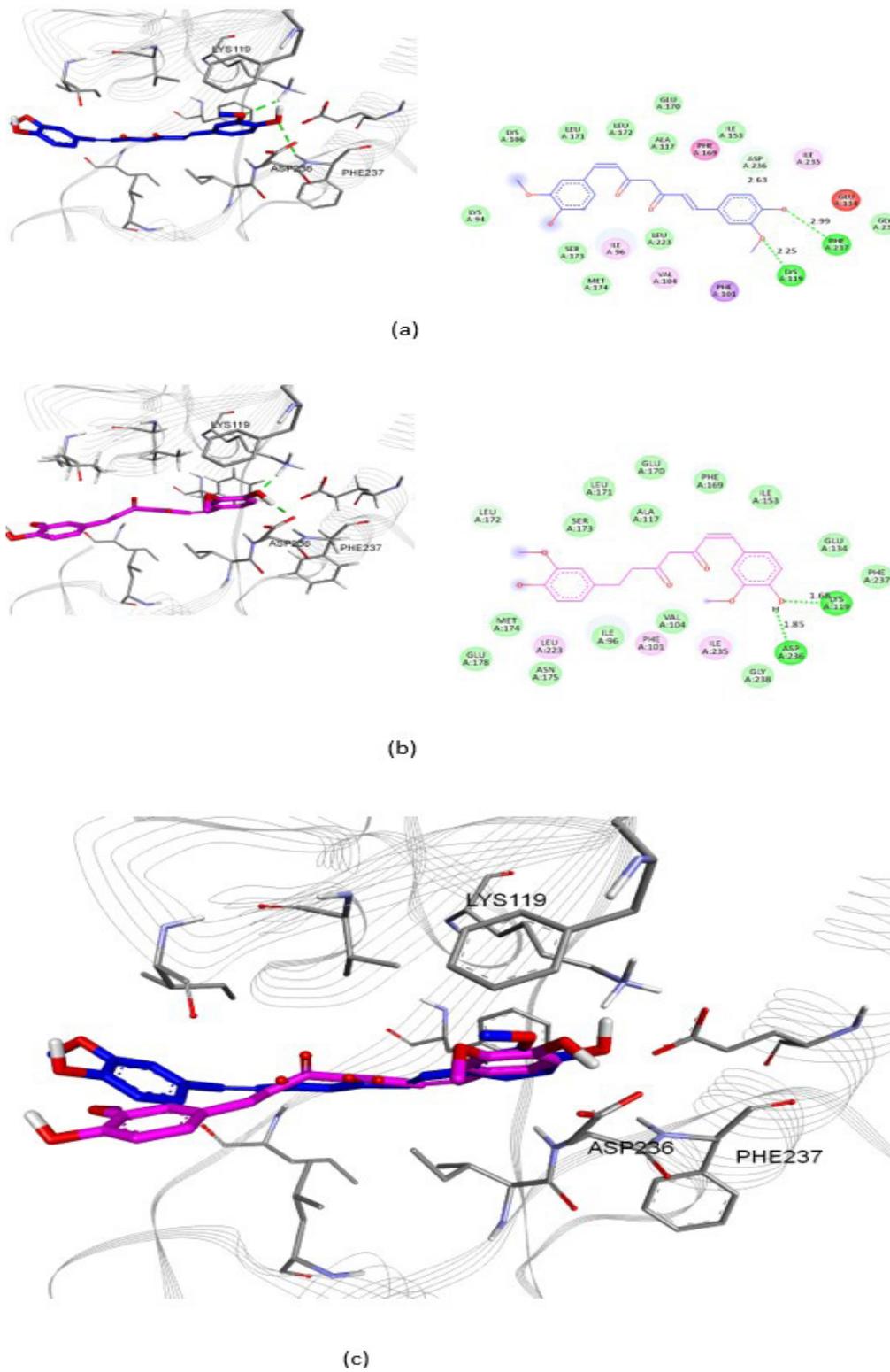
Kompleks ini berada dalam lingkungan air dalam bentuk kotak kubik dengan menggunakan model molekul air TIP3P [22]. Sistem netral diperoleh setelah penambahan ion Na^+/Cl^- . Sistem kesetimbangan yang terdiri dari protein, ion, dan ligan diperoleh setelah simulasi NVT dan NPT pada 298,25 K masing-masing 100 ps. Sistem produksi berlangsung pada suhu 298,25K dan tekanan 1 bar selama 100 ns. Hasil simulasi dianalisis menggunakan nilai RMSD dan RMSF, dan energi bebas ikat dihitung dengan pendekatan MMGBSA [23].

Hasil dan Diskusi

Farmakofor adalah fitur kimia molekul yang berinteraksi dengan reseptor target dalam berbagai mode interaksi, seperti ikatan H, elektrostatik, hidrofobik, sterik, dan atau interaksi non-ikatan lainnya [24]. Setiap molekul dapat memiliki fitur farmakofor yang berbeda dari molekul lain dalam beberapa hal, seperti gugus fungsi, jarak antar

fitur, ruang 3 dimensi yang dibentuk oleh fitur, dan lain-lain. Sekelompok senyawa analog dengan aktivitas farmakologis tertentu (satu set aktif) dapat memiliki model farmakofor tertentu. PharmaGist adalah alat deteksi farmakofor gratis yang melakukan analisis farmakofor berbasis ligan.

Skrining virtual berbasis farmakofor menggunakan PharmaGist terdiri dari tiga tahap, yaitu (i) deteksi farmakofor molekuler set aktif, (ii) validasi model farmakofor, dan (iii) skrining basis data [14]. Deteksi model farmakofor telah dilakukan dengan menggunakan 24 senyawa yang terdiri dari kurkumin dan analognya sebagai set aktif. Secara *in vitro*, rangkaian senyawa ini terbukti mampu mengurangi pertumbuhan eksponensial sel MT-4 dan KB [6]. Suplemen 1 yang berisi file keluaran deteksi farmakofor molekuler senyawa aktif, dapat diketahui bahwa terdapat tiga model farmakofor yang diproduksi dalam pendeteksian farmakofor menggunakan Kurkumin sebagai molekul pivot, yaitu 1.pha, 2.pha, dan 3.pha. Ketiga model farmakofor perlu melalui proses validasi untuk mengetahui mana yang dapat digunakan untuk menyaring senyawa dalam database yang terbaik. Senyawa decoy (decoy set) yang diperlukan dalam proses validasi diperoleh dari database Zinc15 yang dihasilkan menggunakan DecoyFinder 2.0. Kriteria pemodelan terbaik untuk klasifikasi data mining, area di bawah nilai ROC (AUC) [25] dikelompokkan sebagai berikut:



Gambar 3. Kurkumin berada pada situs aktif DYRK2: (a) posisi mula-mula, (b) pose terbaik hasil redocking, (c) tumpang tindih posisi mula-mula (biru), dan setelah redocking (merah)

AUC Value	Description
0,90 – 1,00	Klasifikasi Sangat Baik
0,80 – 0,90	Klasifikasi Baik
0,70 – 0,80	Klasifikasi Wajar
0,60 – 0,70	Klasifikasi Buruk
0,50 – 0,60	Kegagalan

Dalam penelitian ini, analisis farmakofor berbasis ligan dikerjakan dengan bantuan aplikasi PharmaGist. Deteksi farmakofor dilakukan dengan menggunakan 24 senyawa ([Gambar 1](#)) sebagai ligan dengan kurkumin sebagai molekul kunci (pivot) sehingga diperoleh tiga model farmakofor, yaitu 1.pha, 2.pha dan 3.pha (Suplemen 1). Validasi kandidat model farmakofor dilakukan dengan menerapkan evaluasi retrospektif analisis kinerja dengan pendekatan consensus scoring, ROC (receiver operating characteristic), Enrichment dan Predictiveness curves serta ringkasan hasil analisis (metrik global) dari masing-masing model farmakofor yang ditunjukkan pada [Gambar 2](#).

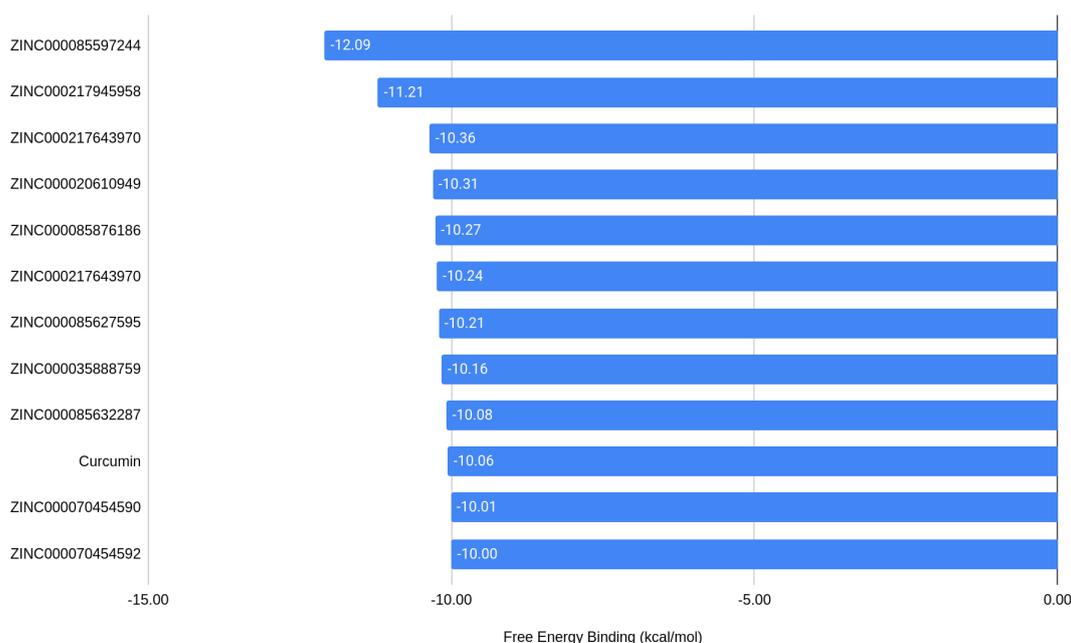
Dari ketiga model farmakofor yang dihasilkan, model farmakofor 2.pha dipilih sebagai model terbaik dibanding 1.pha dan 3.pha. Skrining database senyawa bahan alam dari Zinc15 yang berjumlah 270.547 senyawa menggunakan model farmakofor 2.pha telah diperoleh 110 senyawa sebagai STL1. Penetapan STL1 didasarkan pada nilai skor penyelarasan berpasangan > 40,00 dari

setiap senyawa database (Suplemen 2).

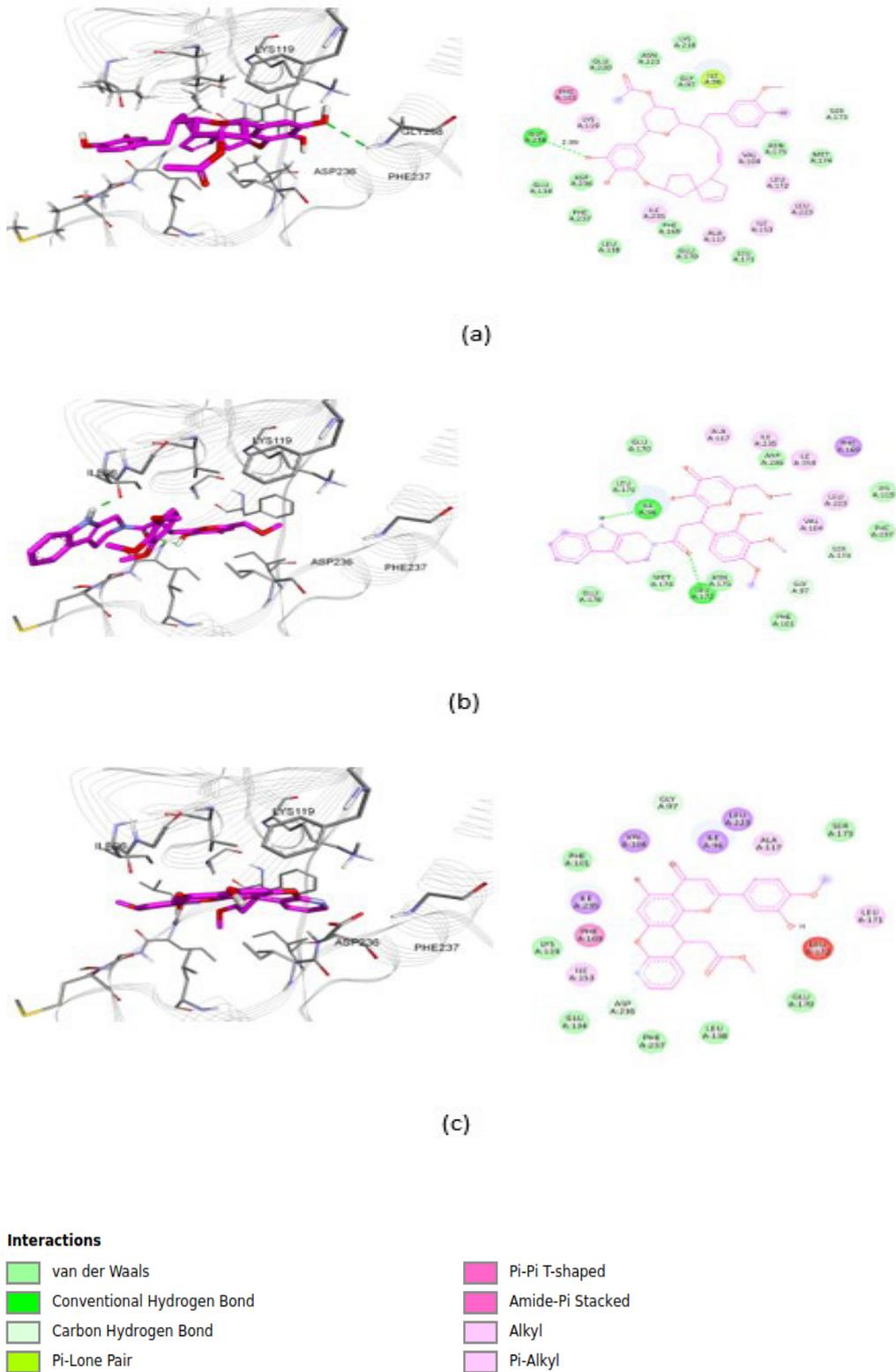
Hasil analisis kurva ROC dengan perhitungan menggunakan aplikasi Screening Explorer menunjukkan bahwa nilai AUC ROC masing-masing model farmakofor adalah: 1.pha = 0,940, 2.pha = 0,976, dan 3.pha = 0,958. Berdasarkan nilai UAC ROC, dapat disimpulkan bahwa ketiga model tersebut termasuk dalam kelompok eksolitik. Namun demikian, 2.pha adalah nilai ROC UAC tertinggi, sehingga model farmakofor ini dipilih untuk penyaringan basis data. Dari 270.547 senyawa bahan alam yang disediakan oleh Zinc15, 110 senyawa (STL1) di antaranya memiliki kesamaan farmakofor dengan set aktif berdasarkan model 2.pha. Struktur molekul 110 STL1 tersedia di folder Suplemen 2.

Situs aktif reseptor dapat ditentukan dengan mudah jika makromolekul target dikristalisasi bersama dengan ligan alami [26,27] berdasarkan data *in vivo* atau *in vitro* bahwa ligan alami memberikan efek farmakologis tertentu yang terkait dengan makromolekul target. Protein dengan kode 5ZTN adalah enzim DYRK2 yang berada dalam kompleksnya dengan kurkumin yang bertindak sebagai inhibitor DYRK2 dengan IC50 sebesar 5 nM [4].

Molecular docking merupakan tahap penting dalam proses skrining virtual karena memproduksi dan menyaring kandidat obat lebih efektif daripada penilaian fisik ribuan senyawa, sehingga meningkatkan tingkat



Gambar 4. Hasil docking ligan uji



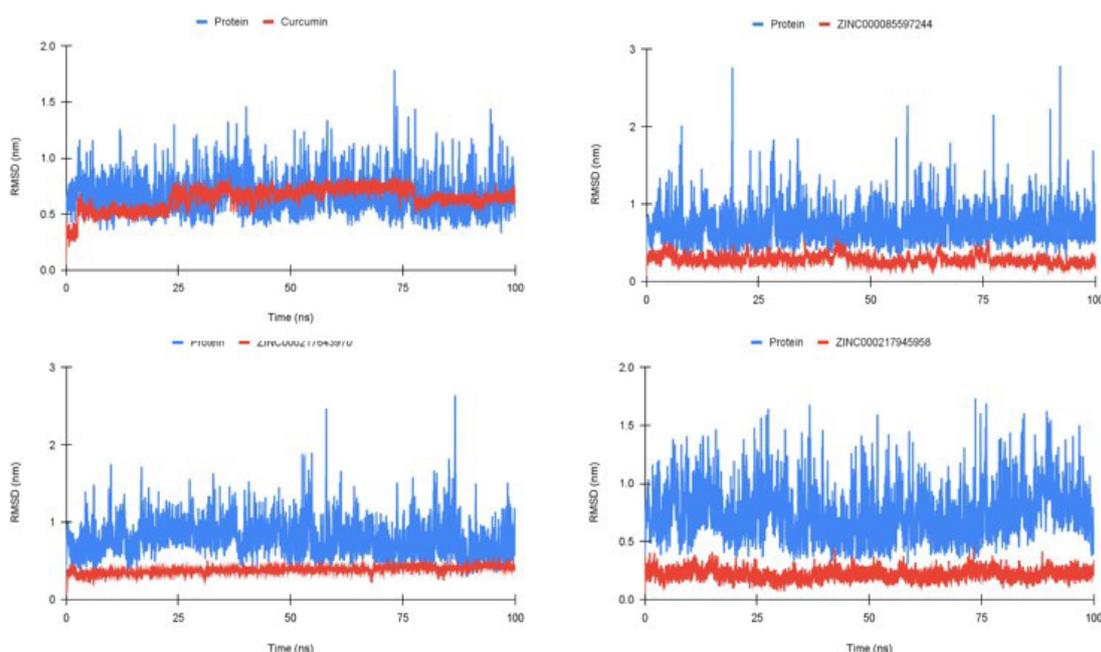
Gambar 5. Interaksi pose terbaik SCS2 dengan situs aktif DYRK2: (a) ZINC00008597244, (b) ZINC000217945958, dan (c) ZINC000217643970

penemuan obat sekaligus mengurangi biaya yang mahal. Docking molekuler memprediksi mode dan afinitas ikatan non-kovalen antara sepasang molekul. Docking molekuler memprediksi orientasi pengikatan yang disukai dari molekul ligan tunggal dengan makromolekul dalam kompleks stabil yang ditunjukkan dengan mengikat energi bebas [27]. Dua pendekatan dalam docking molekuler yang dikenal adalah docking buta (*blind docking*) dan docking lokasi spesifik. Blind docking berarti ligan merapat ligan ke seluruh permukaan makromolekul karena tidak ada informasi tentang tempat pengikatan suatu makromolekul, sedangkan docking lokasi spesifik dilakukan setelah residu pengikatan telah ditentukan terlebih dahulu sehingga ligan uji hanya terikat pada residu situs pengikatan.

Keberadaan kurkumin sebagai ligan alami dari DYRK2 pada kompleks 5ZTN menyebabkan proses docking ligan uji terhadap DYRK2 menerapkan metode docking lokasi spesifik. Validasi situs aktif DYRK2 dilakukan dengan menerapkan protokol re-docking kurkumin sebagai ligan alami. Hasil redocking kurkumin diperoleh pose terbaik dengan RMSD = 1,57Å dan energi bebas pengikatan sebesar -10,06 kkal/mol. Visualisasi struktur ligan alami yang tumpang tindih sebelum dan sesudah redocking ditunjukkan pada Gambar 4. Pose diperoleh pada pengaturan *number grid point* = (34, 46, 34), jarak 0,375 Å dan koordinat pusat kisi = (8,66, -22,126, 20,789). Struktur kristal difraksi sinar-X dari 5ZTN

menunjukkan bahwa interaksi DYRK2 dengan kurkumin dibentuk oleh tiga residu ikatan hidrogen (H-bond), yaitu LYS119, PHE237, dan ASP236, dengan jarak interaksi masing-masing 2,25, 2,99 dan 2,63Å (Gambar 3a). Posisi atom-atom penyusun kurkumin pada situs aktif DYRK2 setelah simulasi redocking ditunjukkan pada Gambar 3b di mana jarak interaksi ikatan-H antara kurkumin dan LYS119 dan ASP236 menjadi 1,68 dan 1,85Å. Dengan demikian, situs aktif DYRK2 dianggap valid sehingga dapat digunakan untuk melakukan protokol docking ligan uji. Pengikatan kurkumin pada tempat pengikatan DYRK2 juga ditunjukkan oleh energi bebas pengikatan prediktif yang bernilai negatif sebesar -10,06 kkal per mol. Asam amino sebagai kantong pengikat DYRK2, yang berada pada jarak hingga 5Å dari ligan berjumlah 21 residu, yaitu ILE96, PHE101, VAL104, VAL105, ALA117, LYS119, GLU134, ILE153, PHE169, GLU170, LEU171, LEU172, SER173, MET174, ASN175, GLU178, LEU223, ILE235, ASP236, PHE237, dan GLY238.

Setiap ligan uji dari STL1 yang berjumlah 110 senyawa menjalani protokol docking dengan *grid map* mengikuti pengaturan proses validasi situs aktif. Hasil docking untuk ligan uji dengan pengikatan energi bebas lebih dari 10,00 kkal per mol dirangkum pada Gambar 4. Tiga senyawa yang memiliki energi bebas ikatan terendah dipilih sebagai STL2, yaitu ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970, dengan energi bebas ikatan



Gambar 6. RMSD ligan dan protein selama simulasi MD 100 ns

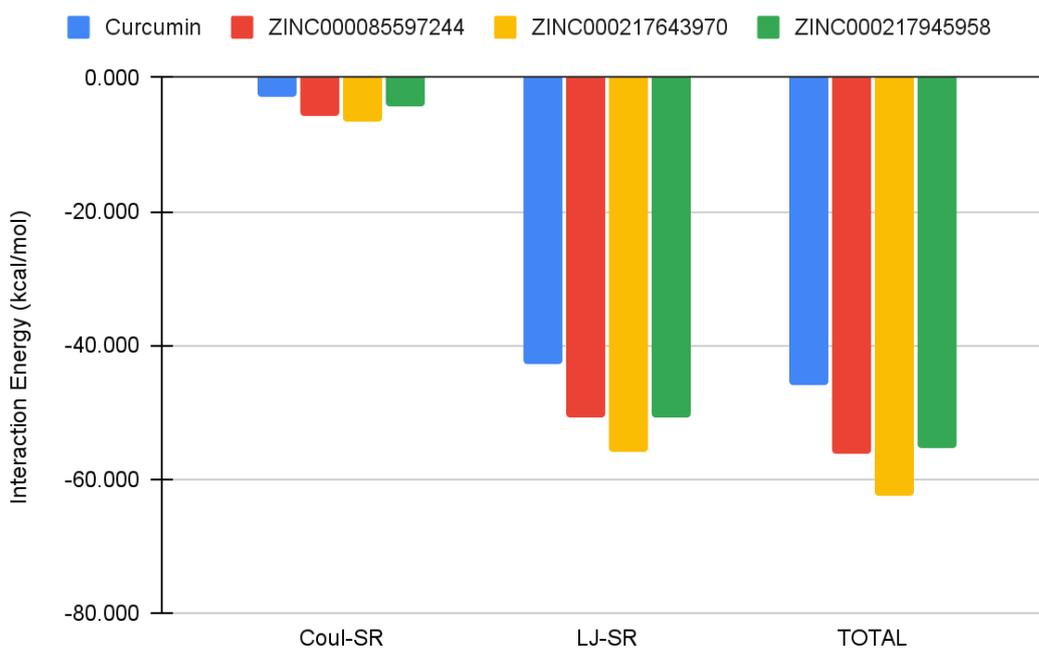
masing-masing -12,09, -11,21, dan -10,31 kkal per mol. [Gambar 5](#) menunjukkan bahwa ketiga ligan berada di lingkungan DYRK2 yang sama dengan tempat kurkumin berada ([Gambar 4](#)). Energi bebas pengikatan bernilai negatif menunjukkan interaksi DYRK2-ligan adalah proses spontan dan stabil dengan energi bebas pengikatan yang lebih kuat daripada interaksi DYRK2-kurkumin.

Stabilitas interaksi antara ligan dengan suatu reseptor biasanya menjalani proses evaluasi dengan menerapkan teknik molekular dinamik (MD) dalam beberapa parameter pengamatan seperti RMSD, RMSF (root mean square fluctuation) secara atomik atau residual active site, energi interaksi, serta energi bebas pengikatan situs aktif total dan residual. RMSD menunjukkan jarak gerak masing-masing atom ligan dan target terhadap sistem selama simulasi. RMSF menunjukkan jarak gerak rata-rata selama simulasi setiap atom atau residu. RMSF yang ditunjukkan dalam penelitian ini hanyalah jarak fluktuasi residu situs aktif dari DYRK2, yaitu pada jarak 5Å dari pusat ligan. Energi interaksi menunjukkan kekuatan interaksi non-ikatan antara makromolekul dan ligan, yang merupakan total energi interaksi coulombik (Coul-SR) dan energi Lennard-Jones. Berbeda dengan energi interaksi, energi bebas pengikatan dihitung dari Mekanika Molekular Generalized Born and Surface Area (MMGBSA) dan atau Mekanika Molekular Poisson-Boltzmann and Surface Area (MMPBSA). MMGBSA dan MMPBSA dihitung dari

jumlah yang sama, yaitu jumlah energi bebas keadaan gas (ΔG Gas) dan energi bebas dalam keadaan terlarut (ΔG Solv), dimana Gas ΔG disumbangkan oleh energi van der Waals (VDWAALS) dan energi elektronik (EEL). Perbedaannya terletak pada komponen ΔG Solving dimana pada MMGBSA adalah jumlah EGB (Generalized Born energy) dan ESUF (surface area energy), MMPBSA disumbangkan oleh EPB (Poisson-Boltzmann energy), ENPOLAR (non-polar solvation energy), dan EDISPER (dispersion energy). EGB dan EPB adalah energi polar, dan yang lainnya adalah energi non-polar [28]. Pada penelitian ini, total energi bebas ikatan menggunakan pendekatan MMGBSA dihitung menggunakan aplikasi GMX-MMPBSA, selain energi bebas sisa dari masing-masing situs DYRK2 asam amino aktif.

Setiap senyawa STL2 (ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970) dalam kompleks dengan protein DYRK2 menjalani simulasi MD selama 100 ns. RMSD DYRK2 dengan setiap molekul STL2 dan kurkumin dirangkum dalam [Gambar 6](#). Berdasarkan grafik RMSD, dapat dilihat bahwa pergerakan protein dan keempat ligan selama simulasi dominan berada pada jarak kurang dari 1,0 nm dari posisi mula-mula.

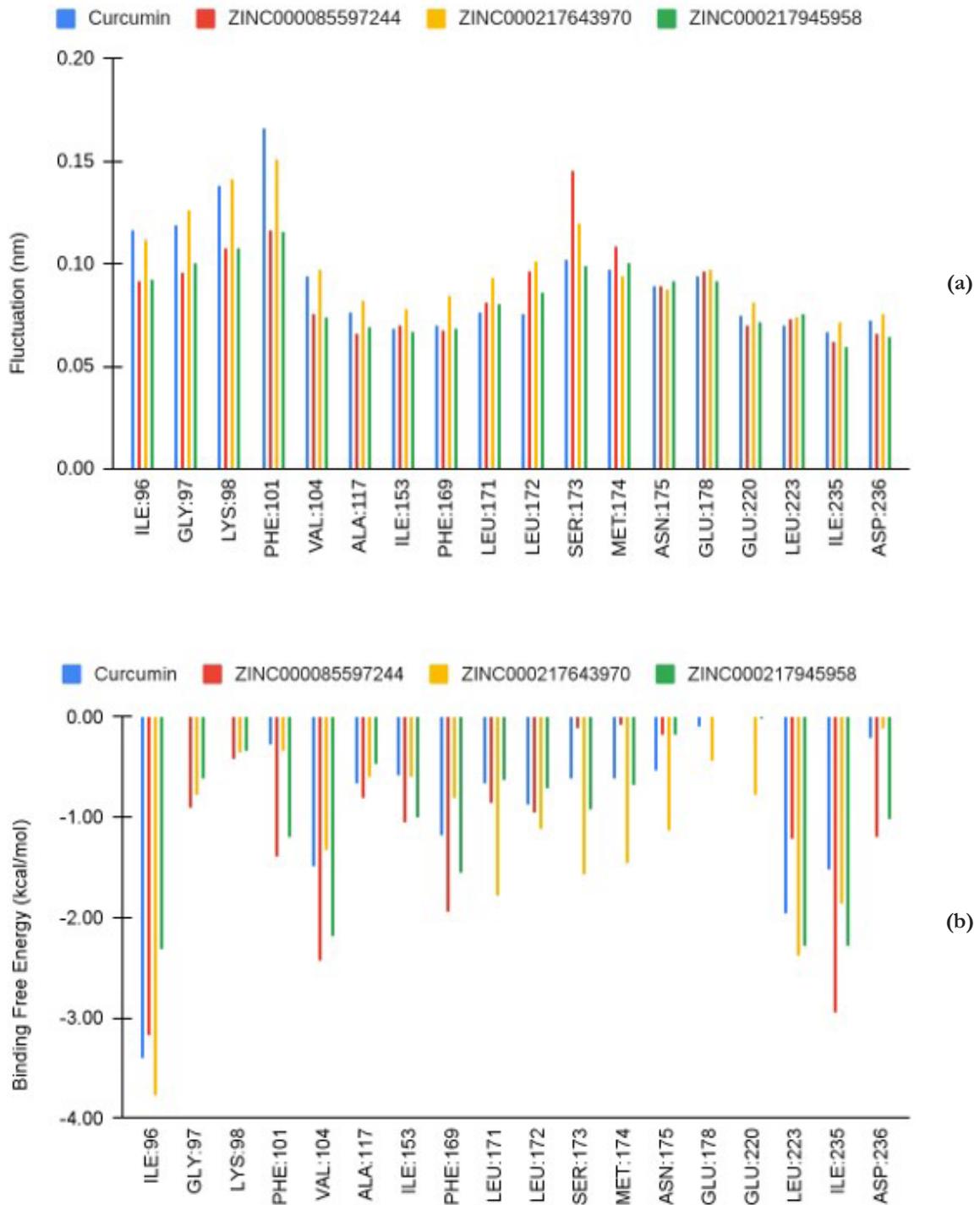
Kekuatan interaksi ligan-DYRK2 di antaranya dapat dilihat pada nilai energi interaksi non-ikatan antara keduanya. Energi interaksi berbeda dengan energi bebas atau energi ikatan [29]. Paket program GROMACS



Gambar 7. Total energi interaksi

menguraikan dan menghitung energi interaksi non-ikatan yang berasal dari energi interaksi Coulombik jarak pendek (Coul-SR) dan Lennard-Jones jarak pendek (LJ-SR). Jumlah rata-rata Coul-SR dan LJ-SR merupakan nilai energi interaksi total [17,18]. Total energi interaksi

DYRK2 dengan Curcumin, ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970 masing-masing adalah -45,808, -56,328, -62,335, dan -55,240 kkal per mol. Energi Coul-SR dan LJ-SR dari masing-masing kompleks ditunjukkan pada Gambar 7.



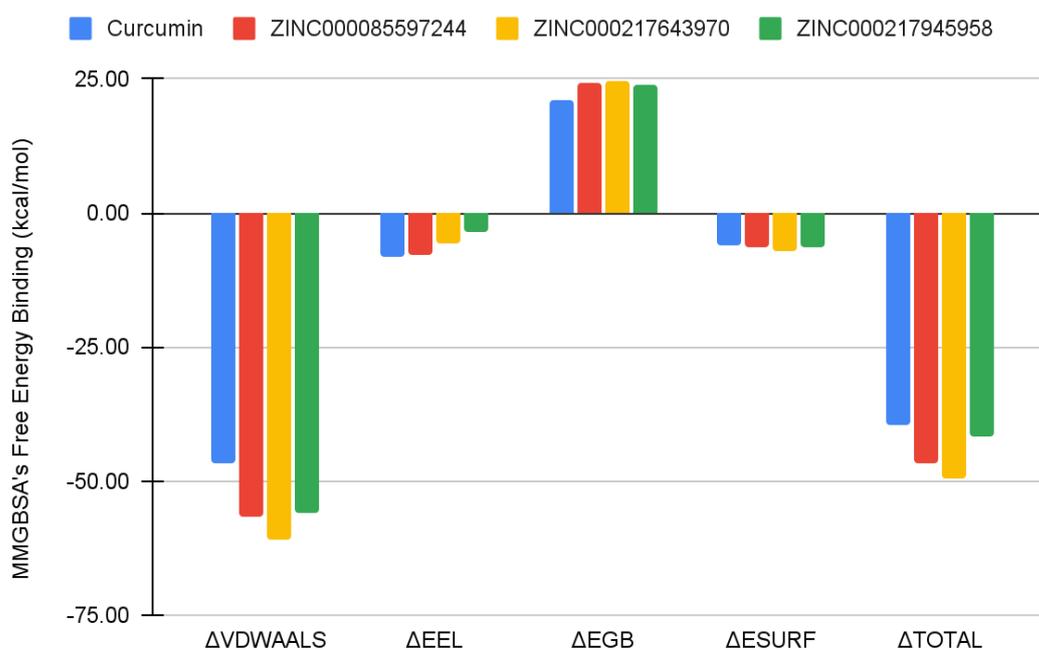
Gambar 8. Kontribusi residu dari situs aktif DYRK2 dalam interaksi ligan: (a) fluktuasi, (b) energi ikatan

Evaluasi stabilitas interaksi protein-ligan juga dapat dilihat pada fluktuasi dan kontribusi energi dari setiap residu reseptor situs aktif dalam interaksi dengan ligan. Situs aktif DYRK2 adalah residu asam amino yang berada pada jarak 5Å dari ligan, sehingga jumlah residu situs aktif dari ligan kurkumin adalah 21 residu (ILE96, PHE101, VAL104, VAL105, ALA117, LYS119, GLU134, ILE153, PHE169, GLU170, LEU171, LEU172, SER173, MET174, ASN175, GLU178, LEU223, ILE235, ASP236, PHE237, GLY238), ZINC000085597244 adalah 26 residu (ILE96, GLY97, LYS98, GLY99, PHE101, VAL104, ALA117, LYS119, GLU134, ILE153, PHE169, GLU170, LEU171, LEU172, SER173, MET174, ASN175, GLU178, LYS218, GLU220, ASN221, LEU223, ILE235, ASP236, PHE237, GLY238), ZINC000217643970 : adalah 23 residu (ILE96, GLY97, LYS98, PHE101, VAL104, ALA117, LYS119, GLU134, ILE153, PHE169, GLU170, LEU171, LEU172, SER173, MET174, ASN175, GLU178, GLU220, LEU223, ILE235, ASP236, PHE237), dan ZINC000217945958 adalah 26 residu (96, GLY97, LYS98, GLY99, PHE101, VAL104, LYS106, ALA117, LYS119, GLU134, LEU138, ILE153, PHE169, GLU170, LEU171, LEU172, SER173, MET174, ASN175, GLU220, ASN221, LEU223, ILE235, ASP236, PHE237, GLY238). Kontribusi energi bebas ikatan dari setiap residu situs aktif dirangkum dalam [Gambar 8b](#). Fluktuasi residu DYRK2 situs aktif selama

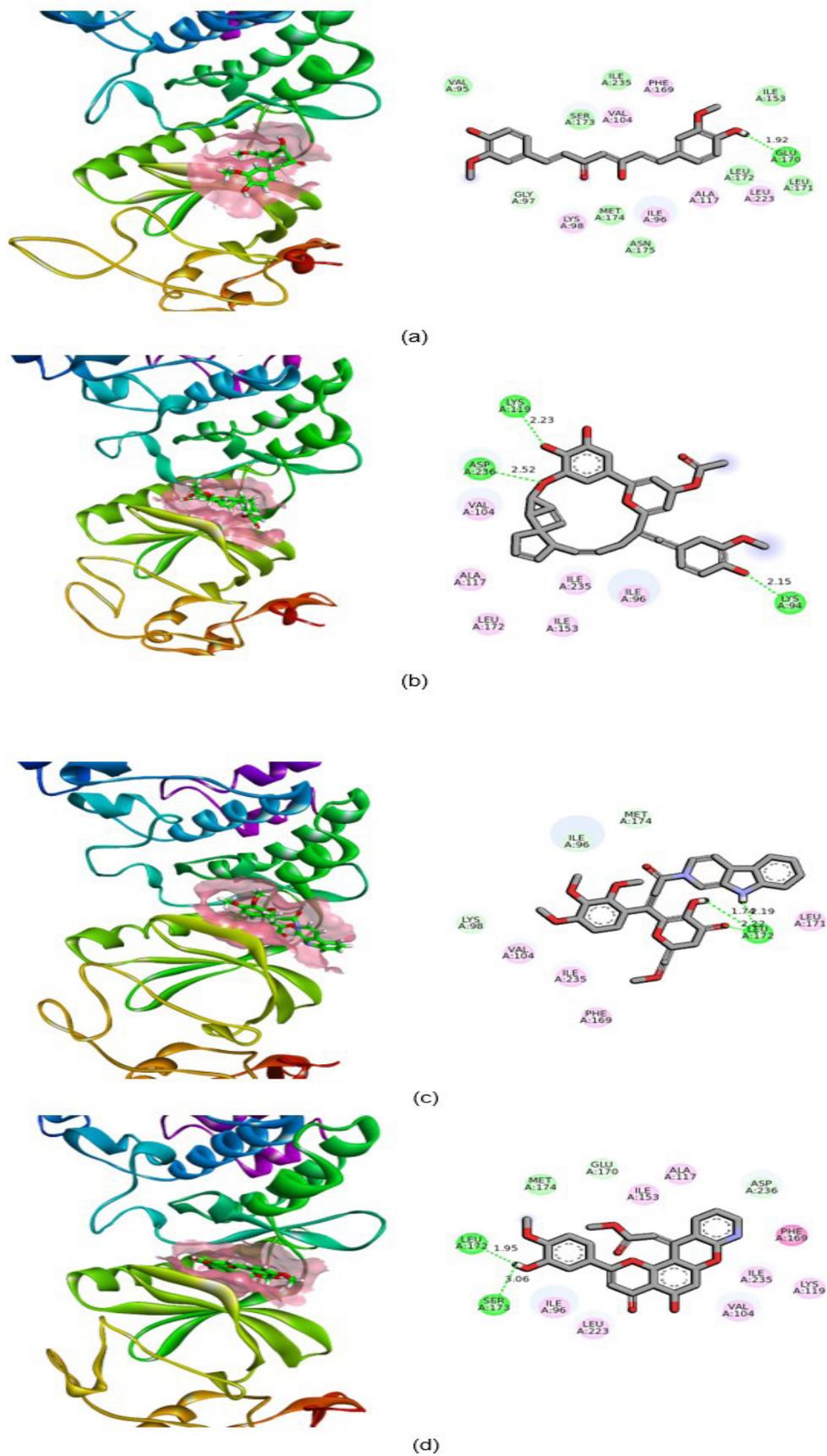
simulasi dirangkum dalam [Gambar 8a](#). [Gambar 8](#) hanya menampilkan residu dengan kontribusi energi bebas dalam interaksi dengan salah satu ligan lebih dari 0,5 kkal / mol.

Perhitungan rata-rata energi bebas pengikatan interaksi ligan-reseptor dilakukan dengan menerapkan metode MMGBSA (Molecular mechanics/Generalized-Born Surface Area). Hasil perhitungan energi bebas pengikatan rata-rata dari interaksi ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970 dengan DYRK2 yang dirangkum pada [Gambar 9](#), masing-masing memiliki energi bebas ikatan rata-rata sebesar -46,69, -49,45 dan -41,81 kkal per mol, sedangkan kurkumin memiliki kekuatan ikatan yang lebih lemah dengan DYRK2, yang hanya -39,60 kkal per mol. [Gambar 9](#) menunjukkan ZINC000217643970 adalah ligan dengan energi bebas ikatan rata-rata terkuat.

Data RMSD ligan terhadap posisi residu asam amino DYRK2 ([Gambar 6](#)) selama simulasi juga mengkonfirmasi spontanitas dan stabilitas interaksi, sedangkan energi bebas ikatan rata-rata menegaskan bahwa ketiga senyawa tersebut memiliki kemampuan penghambatan prediktif yang lebih baik terhadap DYRK2 daripada kurkumin. Berdasarkan analisis residu, hasil simulasi MD menunjukkan bahwa residu asam amino DYRK2 yang membentuk interaksi dengan ligan penyumbang paling kuat (energi bebas ikatan rata-rata < -2,00 kkal/mol) adalah ILE96, VAL104,



Gambar 9. Energi bebas pengikatan interaksi kurkumin, ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970 dengan DYRK2



Gambar 10. Visualisasi interaksi ligan-DYRK2 yang sering muncul selama simulasi MD: Kurkumin (a), ZINC000085597244 (b), ZINC000217643970 (c), dan ZINC000217945958 (d)

LEU223, dan ILE235. ILE96 membentuk ikatan-H dengan ZINC000085597244 dan ZINC000217945958, sedangkan dengan ZINC000217643970, membentuk interaksi ikatan non-hidrofobik. VAL104 membentuk interaksi hidrofobik dengan ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970. LEU223 membentuk interaksi hidrofobik dengan ZINC000085597244 dan ZINC000217945958 sedangkan dengan ZINC000217643970 berada pada jarak di atas 5Å sehingga jenis interaksi yang mungkin terjadi tidak terdeteksi. ILE235 membentuk interaksi alkil hidrofobik dengan ketiga ligan.

Analisis mode pengikatan Kurkumin, ZINC000085597244, ZINC000217643970, dan ZINC000217945958 dengan situs ikatan DYRK2 dilakukan melalui identifikasi konformasi yang berbeda pada mode pengikatan keempat ligan dengan DYRK2 selama simulasi MD dengan menggunakan analisis kluster. Analisis kluster dilakukan dengan menggunakan metode gromos dengan *cutoff* RMSD sebesar 0.15 nm pada rentang trajectory 50 sampai 100 ns. Pada kompleks Kurkumin-DYRK2 teridentifikasi 13 kluster dengan kluster teratas sebesar 74,88% dari total konformasi interaksi yang menunjukkan bahwa kurkumin berada pada kedudukan yang ideal dalam membentuk interaksi dengan DYRK2 yang dibentuk oleh residu Glu170 melalui ikatan hidrogen seperti ditunjukkan pada [Gambar 10a](#). RMSD kompleks Kurkumin-DYRK2 selama simulasi dari 50 sampai 100 ns berada pada rentang 0,0565047 sampai 0,330957 nm dengan RMSD rata-rata 0,152814 nm. Pada kompleks ZINC000085597244-DYRK2 teridentifikasi 6 kluster dengan kluster teratas sebesar 95,86% dari total konformasi interaksi yang menunjukkan bahwa ZINC000085597244 berada pada kedudukan yang ideal dalam membentuk interaksi dengan DYRK2 yang dibentuk oleh residu LYS94, LYS119 dan ASP236 melalui ikatan hidrogen seperti ditunjukkan pada [Gambar 10b](#). RMSD kompleks ZINC000085597244-DYRK2 selama simulasi dari 50 sampai 100 ns berada pada rentang 0,0519323 sampai 0,344799 nm dengan RMSD rata-rata 0,139024 nm. Pada kompleks ZINC000217643970-DYRK2 teridentifikasi 10 kluster dengan kluster teratas sebesar 83,72% dari total konformasi interaksi yang menunjukkan bahwa ZINC000085597244 berada pada kedudukan yang ideal dalam membentuk interaksi dengan DYRK2 yang dibentuk oleh 3 ikatan hidrogen oleh LEU172 seperti ditunjukkan pada [Gambar 10c](#). RMSD kompleks ZINC000217643970-DYRK2 selama simulasi 50 sampai 100 ns berada pada rentang 0,0552717 sampai 0,352544 nm dengan RMSD rata-rata 0,153769 nm. Pada kompleks ZINC000217945958-

DYRK2 teridentifikasi 13 kluster dengan kluster teratas sebesar 75,97% dari total konformasi interaksi yang menunjukkan bahwa ZINC000217945958 berada pada kedudukan yang ideal dalam membentuk interaksi dengan DYRK2 yang dibentuk oleh 2 ikatan hidrogen yaitu oleh residu LEU172 dan SER173 seperti ditunjukkan pada [Gambar 10d](#). RMSD kompleks ZINC000217643970-DYRK2 sepanjang simulasi dari 50 sampai 100 ns berada pada rentang 0,0565047 sampai 0,330957 dengan RMSD rata-rata 0,152814 nm.

Kesimpulan

Tiga analog kurkumin yang diperoleh melalui skrining berbasis farmakofor, yaitu ZINC000085597244, ZINC000217945958, dan ZINC000217643970, diprediksi memiliki kemampuan penghambatan spesifik yang lebih baik terhadap DYRK2 daripada kurkumin, yang dikonfirmasi melalui docking molekuler dan simulasi dinamika molekuler. Kemampuan penghambatan menunjukkan bahwa ketiga analog kurkumin berpotensi menjadi antikanker dengan mekanisme kerja untuk menghambat DYRK2, yang merupakan regulator positif dari proteasome 26S.

Referensi

- [1]. M. A. Tomeh, R. Hadianamrei, and X. Zhao, "A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 5, 2019, doi: 10.3390/ijms20051033.
- [2]. E. Chainoglou and D. Hadjipavlou-Litina, "Curcumin analogues and derivatives with anti-proliferative and anti-inflammatory activity: Structural characteristics and molecular targets," <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1614560>, vol. 14, no. 8, pp. 821–842, Aug. 2019, doi: 10.1080/17460441.2019.1614560.
- [3]. A. Giordano and G. Tommonaro, "Curcumin and Cancer," *Nutrients*, vol. 11, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/NU11102376.
- [4]. S. Banerjee et al., "Ancient drug curcumin impedes 26S proteasome activity by direct inhibition of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 32, p. 201806797, 2018, doi: 10.1073/pnas.1806797115.
- [5]. F. Paulraj, F. Abas, N. H. Lajis, I. Othman, and R. Naidu, "Molecular Pathways Modulated by Curcumin Analogue, Diarylpentanoids in Cancer," *Biomolecules*, vol. 9, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/BIOM9070270.
- [6]. M. Artico et al., "Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling.," *J Med Chem*, vol. 41, no. 21, pp. 3948–60, 1998, doi: 10.1021/jm9707232.
- [7]. "ZINC." <https://zinc15.docking.org/substances/subsets/natural-products/> (accessed Sep. 27, 2022).
- [8]. "Decoy Finder 2.0 | Macs in Chemistry." <https://www.macsinchem.org/blog/files/82be9fdea59e8e6dd18b7ee06bc027d9-1718.php> (accessed Sep. 27, 2022).
- [9]. "RCSB PDB- 5ZTN: The crystal structure of human DYRK2 in complex with Curcumin." <https://www.rcsb.org/structure/5ztn> (accessed Sep. 27, 2022).
- [10]. "Visualization- BIOVIA- Dassault Systèmes®." <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/visualization/> (accessed Mar. 05, 2022).

- [11]. "About MODELLER." <https://salilab.org/modeller/> (accessed Apr. 09, 2023).
- [12]. "UCSF Chimera Home Page." <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/> (accessed Apr. 09, 2023).
- [13]. "mglttools." <https://ccsb.scripps.edu/mglttools/> (accessed Sep. 27, 2022).
- [14]. D. Schneidman-Duhovny, O. Dror, Y. Inbar, R. Nussinov, and H. J. Wolfson, "PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. Web Server issue, pp. 223–228, 2008, doi: 10.1093/nar/gkn187.
- [15]. "Screening Explorer- Interactive ROC, Enrichment & Predictiveness metrics." <http://stats.drugdesign.fr/> (accessed Apr. 09, 2023).
- [16]. The Scripps Research Institute, "AutoDock." 2016.
- [17]. D. Van Der Spoel, H. Henschel, P. J. Van Maaren, M. M. Ghahremanpour, and L. T. Costa, "A potential for molecular simulation of compounds with linear moieties," *J Chem Phys*, vol. 153, no. 8, p. 084503, Aug. 2020, doi: 10.1063/5.0015184.
- [18]. M. Lundborg, J. Lidmar, and B. Hess, "The accelerated weight histogram method for alchemical free energy calculations," *J Chem Phys*, vol. 154, no. 20, May 2021, doi: 10.1063/5.0044352.
- [19]. K. Lindorff-Larsen et al., "Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field," *Proteins*, vol. 78, no. 8, pp. 1950–1958, Jun. 2010, doi: 10.1002/PROT.22711.
- [20]. "AmberTools21." <https://ambermd.org/AmberTools.php> (accessed Mar. 05, 2022).
- [21]. A. W. Sousa Da Silva and W. F. Vranken, "ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE," *BMC Res Notes*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, Jul. 2012, doi: 10.1186/1756-0500-5-367/FIGURES/3.
- [22]. S. Y. Liem and P. L. A. Popelier, "The influence of water potential in simulation: a catabolite activator protein case study," *J Mol Model*, vol. 25, no. 8, pp. 1–10, Aug. 2019, doi: 10.1007/s00894-019-4095-3/FIGURES/7.
- [23]. M. S. Valdés-Tresanco, M. E. Valdés-Tresanco, P. A. Valiente, and E. Moreno, "Gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS," *J Chem Theory Comput*, vol. 17, no. 10, pp. 6281–6291, Oct. 2021, doi: 10.1021/ACS.JCTC.1C00645.
- [24]. T. Seidel, O. Wieder, A. Garon, and T. Langer, "Applications of the Pharmacophore Concept in Natural Product inspired Drug Design," *Mol Inform*, vol. 39, no. 11, Nov. 2020, doi: 10.1002/MINF.202000059.
- [25]. A. J. Bowers and X. Zhou, "Receiver Operating Characteristic (ROC) Area Under the Curve (AUC): A Diagnostic Measure for Evaluating the Accuracy of Predictors of Education Outcomes," <https://doi.org/10.1080/10824669.2018.1523734>, vol. 24, no. 1, pp. 20–46, Jan. 2019, doi: 10.1080/10824669.2018.1523734.
- [26]. A. Asnawi, L. O. Aman, Nursamsiar, A. Yuliantini, and E. Febrina, "MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMIC STUDIES: SCREENING PHYTOCHEMICALS OF *Acalypha indica* AGAINST BRAF KINASE RECEPTORS FOR POTENTIAL USE IN MELANOCYTIC TUMOURS," *Rasayan Journal of Chemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 1352–1361, Apr. 2022, doi: 10.31788/RJC.2022.1526769.
- [27]. S. G. A. K. B. S. U. G. Akhil Sharma, "Molecular Docking studies on the Anti-viral activity of Cellulose Acetate Phthalate (CAP) as an adjuvant against SARS-CoV-2 by Protease Mpro," *An Interdisciplinary Journal of Neuroscience and Quantum Physics*, vol. Volume 20, no. No 15, pp. 6481–6490, 2022, doi: 10.48047/NQ.2022.20.15.NQ88647.
- [28]. M. S. Valdés-Tresanco, M. E. Valdés-Tresanco, P. A. Valiente, and E. Moreno, "gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS," *J Chem Theory Comput*, vol. 17, no. 10, pp. 6281–6291, Oct. 2021, doi: 10.1021/ACS.JCTC.1C00645.
- [29]. "Protein-Ligand Complex." http://www.md-tutorials.com/gmx-complex/09_analysis.html (accessed Sep. 28, 2022).



Copyright © 2023 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)