

## **STUDI KOMPUTASI: INTERAKSI PROTEIN AKT DAN METABOLIT SEKUNDER *Curcuma zedoaria* SEBAGAI AGEN IMUNOMODULATOR**

**Putu Oky Ari Tania<sup>1</sup>, Candra Rini Hasanah Putri<sup>2</sup>, Ayling Sanjaya<sup>3</sup>, Titiiek Sunaryati<sup>4</sup>, Deddy Hartanto<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Biomedik Penelitian Biomolekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

<sup>2</sup>Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

<sup>3</sup>Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

<sup>4</sup>Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

<sup>5</sup>Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya  
Jalan Dukuh Kupang XXV/54, Surabaya, Indonesia.

\*Email: [putuoky@uwks.ac.id](mailto:putuoky@uwks.ac.id)

### **Abstrak**

*Penyakit inflamasi sistemik yang kronis seperti reumatoid arthritis, sistemik lupus eritematosus, multipel sklerosis memberikan beban, memerlukan biaya terapi yang besar dan menyebabkan kematian. Paparan stres, antigen, polutan berkontribusi terhadap terganggunya signaling protein termasuk sistem imun. Protein Akt penting dalam maturasi, diferensiasi dan daya hidup sel myeloid. Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi metabolit sekunder dalam *Curcuma zedoaria* yaitu demethoxycurcumin, curcumenol dan germacrone dalam menghambat protein Akt, sehingga dapat dikategorikan sebagai agen imunomodulator. Metode yang dilakukan adalah melakukan prediksi fisikokimia ligan (PKCSM), dan molekular docking antara protein Akt (3O96) dan 3 ligan demethoxycurcumin, curcumenol dan germacrone (PyRx). Hasil penelitian didapatkan bahwa ligan yang digunakan memenuhi kriteria Lipinski's rule of five. Binding affinity yang didapatkan untuk demethoxycurcumin adalah -9,0kcal/mol, curcumenol adalah -7,9 Kcal/mol, germacrone adalah 7,3Kcal/mol sedangkan ligan uniknya yaitu IQO adalah 14.4 Kcal/mol. Binding affinity terendah adalah demethoxycurcumin yang menunjukkan bahwa demethoxycurcumin yang paling kuat dalam berikatan dengan protein Akt.*

**Kata kunci:** Akt, *Curcuma zedoaria*, imunomodulator

### **PENDAHULUAN**

Suatu proses inflamasi adalah respon tubuh terhadap mekanisme pertahanan tubuh. Berbagai faktor seperti infeksi patogen, kerusakan jaringan, infark kardial dapat menginduksi inflamasi (Chen et al., 2018). Material non patogen juga dapat mencetuskan inflamasi, contohnya paparan polutan lalulintas terkait dengan respon biologikal pada inflamasi radang sendi kronis (Adami et al., 2022). Namun demikian, proses inflamasi yang berlangsung terus menerus, akan menimbulkan suatu kondisi patologis.

Pada banyak kondisi kronis, respon inflamasi akan berlanjut dan menyebabkan kerusakan organ dan jaringan yang serius, bahkan berasosiasi dengan beberapa penyakit kronis terutama penyakit autoimun, termasuk Reumatoid Arthritis (RA), Inflammatory bowel disease (IBD), Systemic Lupus Erythematosus (SLE), gout dan diabetes (Duan et al., 2019). Kondisi patologis yang lain terkait dengan penyakit yang dimediasi imun atau *Immune-mediated disease* (IMIDs) yang ditandai dengan disregulasi dan aktivasi tidak terkontrol dari sistem imun yang mengakibatkan inflamasi sistemik (Adami et al., 2022).

Perlindungan tubuh dari berbagai kondisi patologis tersebut diperantarai sistem imun yang efektif. Sistem imun yang efektif akan mampu berfungsi untuk memodulasi sistem imun atau sebagai imunomodulator (Mesaik et al., 2012). Protein Kinase AKT atau Kinase B adalah protein kinase spesifik serine yang mengatur metabolisme dan transformasi seluler (Zhang et al., 2013)

AKT, bersama Phosphoinositide 3-Kinase, bagian penting dari kaskade sinyal Tyrosine Kinase dan bertindak sebagai Pensinyalan PI3K/AKT, cara pensinyalan ini merangsang kelangsungan hidup sel dan faktor pertumbuhan (Govindammal et al., 2021), yang dapat dikaitkan juga dengan fungsi imunomodulasi.

*Curcuma zedoaria* mengandung minyak atsiri, polisakarida dan curcuminoid yang telah diisolasi dan mengandung 1,7bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadin-3,5-dione, demethoxycurcumin dan bisdemetoksikurkumin (Yu et al., 2020). Profilinfrimpangnya dengan GC-MS mengandung golongan heksana, sesquiterpen, fenolik, keton, curcuminoid (Tania et al., 2022). Pemanfaatan bahan aktif seperti komponen fenolik dan polisakarida pada herbal, terbukti dapat berperan sebagai imunomodulator yang potensial (Zhang et al., 2018). Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi efikasi dari *Curcuma zedoaria* sebagai imunomodulator terhadap protein AKT melalui studi komputasi.

## METODE

### Tahap Persiapan

- a. Instalasi perangkat lunak PyMOL, Discovery Studio 2016, dan PyRx pada *notebook* yang akan digunakan. Spesifikasi *notebook* yang akan digunakan instalasi minimal adalah *dual core processor*, 2 GHz, RAM 2GB, dengan tipe sistem Windows 8 Enterprise – 64 bit *operating system*.
- b. Penyiapan alat untuk ekstraksi yaitu pisau, blender, tabung Erlenmeyer, dan *rotary vacuum evaporator*. Timbangan analitik dengan ketelitian 4 angka ukuran di belakang koma. Alat untuk uji *in silico* adalah perangkat lunak PyMOL untuk visualisasi molekul, Discovery Studio 2016 untuk pembuatan struktur 3D molekul, dan PyRx untuk "*docking*" molekul..

### Tahap Pelaksanaan

- a. Koleksi Kunyit putih (*Curcuma zedoaria*). Kunyit putih yang telah diperoleh dari UPT Materia Medica, Batu Jawa Timur. Simplisia didapatkan berupa serbuk kunyit putih sebesar 1000 gram. Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%. Dari 500 gram serbuk didapatkan 58 gram ekstrak kental kunyit putih. Ekstrak kunyit putih disimpan dalam lemari es dalam keadaan tertutup rapat.
- b. Pembuatan ekstrak akan dilakukan pada rimpang kunyit putih dicuci pada air mengalir, dipotong menjadi potongan yang lebih kecil, lalu dikeringkan ditempat dingin. Potongan yang kering dihaluskan dengan blender, disaring, sehingga didapat bubuk berwarna kekuningan. Bubuk kunyit putih selanjutnya diekstrak menggunakan etanol selama 72 jam. Ekstrak didapatkan melalui evaporasi dengan vakum evaporator (Kaushik & Jalalpure, 2011).

### Tahap Pengumpulan Data

- a. Tahap biokomputasi molekuler secara *in silico* akan dilakukan dengan cara identifikasi struktur kimia dari senyawa aktif. Data ini diperoleh dari *database* NCBI berupa data *canonical SMILES*. Bila tidak ditemukan maka akan dibuatkan struktur 3D menggunakan Discovery Studio 2016. Data disimpan dalam format .pdb dan ditampilkan pada PyMOL. Uji "*docking*" molekul dilakukan pada perangkat PyRx untuk mengetahui terjadinya aktivitas ikatan antara senyawa aktif dengan target protein. Senyawa kandidat yang digunakan pada penelitian ini adalah demethoxycurcumin, curcumenol dan germacrone. Protein yang akan dilihat aktivitasnya terhadap senyawa kandidat yaitu AKT.
- b. Hasil uji *in silico* yang diperoleh dan dibandingkan dengan senyawa standar atau ligan unik/alami. Hasil uji berupa data ikatan hidrogen, letak pengikatan pada sisi aktif reseptor, dan asam amino yang menjadi lokasi pengikatan. Tahapan ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemilihan dan reparasi Senyawa Uji

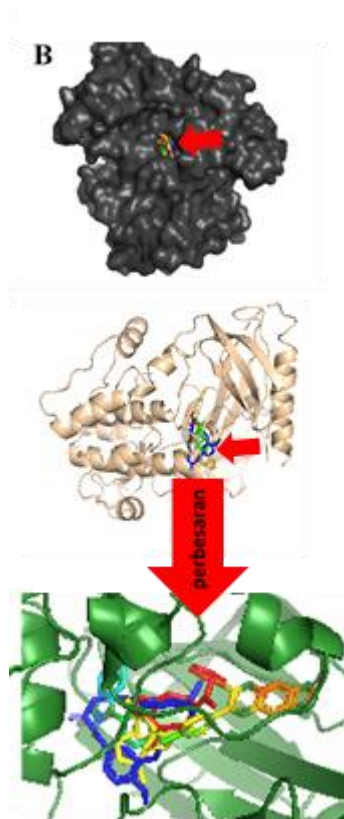
Pemilihan senyawa uji/ kandidat berdasarkan studi literatur, yaitu Demetoxycurcumin, curcumenol dan germacrone. Struktur senyawa uji sebagai kandidat diambil melalui *database* yaitu untuk demethoxycurcumin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5469424> lalu untuk curcumenol <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/167812> yang terakhir adalah germacrone yaitu <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436348>. Ketiga senyawa uji tersebut dalam struktur tiga dimensi dapat disimpan dalam format "sdf", untuk diubah ke bentuk "pdf" menggunakan aplikasi PyMOL.

Diketahui bahwa Curcumin merupakan salah satu curcuminoid utama, diketahui menghambat fungsi imunostimulan dari sel dendritik dan mengganggu maturasi sel dendritik myeloid, gangguan produksi sitokin pro inflamasi (IL-13) karena penghambatan aktivasi *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) dan translokasi *Nuclear Factor kappa B* (NF-κB) (Catanzaro et al., 2018). Germacrone merupakan antiviral yang kuat, seperti aktivitas anti inflamasinya (He et al., 2019)). Komponen bioaktif curcumenol diidentifikasi sebagai komponen sitotoksik dan menginduksi apoptosis (Hamdi et al., 2014).

Sistem imun juga akan memodulasi adanya gangguan di dalam sel, seperti adanya sel tumor. *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) diaktifkan dan kemudian mengaktifkan serine/ threonine protein kinase B (PKB/AKT). PI3K pertama kali ditemukan sebagai gen onkogenik yang mengubah sel normal menjadi sel tumor. Protein ini diklasifikasikan menjadi 3 klas. Sinyal PI3K terlibat dalam proliferasi, survival, metabolisme, dan imunitas. Penghambatan sinyal PI3K melemahkan respon imun dengan cara menekan sekresi sitokin proinflamasi, intervensi pada jalur PI3K ini mungkin efektif untuk penyakit inflamasi (Xie et al., 2014). Sehingga, jalur ini berperan sebagai antiinflamasi.

### Pencarian dan Preparasi Protein Target

Protein target yang digunakan yaitu MAPK9 (Kode PDB: 3NPC), AKT (Kode PDB: 3O96), dan IL-2 (Kode PDB: 1PW6), sedangkan ligan yang di *docking* adalah 4 senyawa kandidat yaitu demetoxycurcumin (Pubchem ID: 9952605), curcumenol (Pubchem ID 167812), Germacrone (Pubchem ID: 6436348) dan ligan unik masing-masing protein target. Ligan unik untuk protein target antara lain ligan B96, IQO, dan FRB. Struktur tiga dimensi masing-masing protein diambil dari *database* RCSB Protein Data Bank yaitu untuk MAPK <https://www.rcsb.org/structure/3NPC>; AKT <https://www.rcsb.org/structure/3O96>; dan IL-2 <https://www.rcsb.org/structure/1PW6> kriteria masing-masing protein menggunakan struktur X-Ray dengan resolusi < 3,00 Å, dengan organisme *homo sapiens*. Selanjutnya data disimpan dalam bentuk "pdb". Struktur 3 dimensi masing-masing protein dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 1. Kompleks protein target dengan AKT ligan (sumber: Pymol)  
 Keterangan: Gambar atas struktur protein *surface*; gambar bawah protein *licorice*  
 Ligan unik: rantai dengan spektrum warna adalah ligan unik masing-masing protein  
 Demethoxycurcumin: rantai berwarna biru adalah demethoxycurcumin  
 Curcumenol: rantai berwarna jingga adalah curcumenol  
 Germacrone: rantai berwarna merah adalah germacrone

protein AKT dengan ligan unik IQO menunjukkan ikatan di beberapa titik dengan semua senyawa kandidat, nampak adanya *overlapping* atau tumpang tindihnya ikatan berbagai warna yang menunjukkan rantai masing-masing ligan. Keberlangsungan hidup sel dipengaruhi oleh beberapa hal. Perlekatan antar sel dan interaksi dengan matriks ekstraseluler (ECM) sangat penting untuk pertumbuhan dan keberlangsungan hidup sel. Abnormalitas ECM dapat berakibat pada kematian sel yang disebut dengan anoikis (Adeshakin et al., 2021). Hal ini menunjukkan curcumenol dan germacrone memiliki aktivitas dalam kematian sel melalui jalur AKT.

Molecular docking dengan software PyRx antara senyawa kandidat imunomodulator yaitu demethoxycurcumin, germacrone dan curcumeol yang berinteraksi dengan protein AKT dapat dilihat nilai energi *binding affinity*nya pada Tabel 1.

**Tabel 1. Nilai *Binding Affinity* interaksi protein-ligan**

Protein	<i>Binding Affinity</i> (Kkal/ mol)			
	Senyawa Kandidat/ ligan			
Target	Demethoxycurcumin	Curcumenol	Germacrone	Ligan unik
AKT	-9,0	-7,9	-7,3	-14.4

Pada protein AKT diketahui *binding affinity* paling rendah ada pada ligan demethoxycurcumin yaitu -9,0 kkal/ mol. Semakin rendah *binding affinity* akan memiliki ikatan paling stabil dan berpotensi untuk berinteraksi secara alamiah. Oleh karena itu di semua interaksi ligan dan protein dipilih posisi 0 yang memiliki *binding affinity* yang paling rendah.

Penelitian ini menunjukkan hasil *docking* antara protein AKT dan berbagai senyawa kandidat, menunjukkan protein AKT memiliki *binding affinity* dengan demethoxycurcumin yang terendah yaitu -9,0 kkal/ mol, dibandingkan ligan uniknya yaitu IQO dengan *binding affinity* sebesar -14,4 kkal/ mol. Protein AKT merupakan bagian penting dari kaskade sinyaling tirosin kinase dan perannya dalam sinyaling PI3K/AKT. Sinyal ini akan menstimulasi kemampuan bertahan hidup sel dan faktor pertumbuhan (Govindammal et al., 2021). Aktivasi *Akt-independent* pada jalur PI3K dan mutasi PIK3CA dapat menyebabkan terjadinya kanker. Jalur PI3K/Akt/mTOR merupakan jalur utama yang terkait dengan proliferasi dan tumor pada kanker di manusia. Protein pada jalur ini berpotensi sebagai target obat antikanker (Kawade et al., 2018).

**Tabel 2.** Residu Asam Amino pada Kandidat Senyawa dan Ligan

Protein	Kandidat senyawa	Residu Asam Amino	Interaksi
AKT	Demethoxycurcumin	<b>Val270</b> , Arg 273, <b>Trp80</b> , Tyr272	Hidrofobik
		Trp80, Gln79, Ser205	Ikatan hidrogen
	Curcumenol	<b>Val270</b> , <b>Leu264</b> , <b>Ile84</b> , <b>Trp80</b> , Tyr272	Hidrofobik
		Val271	Ikatan hidrogen
Germacrone	<b>Val270</b> , Arg273, <b>Trp80</b> , Tyr272	Hidrofobik	
IQO	<b>Leu264</b> , <b>Trp80</b> , <b>Val270</b> , Leu210, <b>Ile84</b>	Hidrofobik	

Kompleks AKT dengan demethoxycurcumin, curcumenol dan germacrone memiliki masing-masing 7 asam amino, 6 asam amino, dan 4 asam amino yang membentuk ikatan hidrofobik dan hidrogen. Pada kompleks AKT-demethoxycurcumin, didapatkan tiga ikatan hidrogen yang terbentuk dari residu asam amino Trp80, Gln79, Ser205. Berdasarkan (Shofi et al., 2021) dikatakan bahwa senyawa berpotensi sebagai kandidat obat bila memiliki ikatan hidrogen, dan nilai *Binding affinity*nya kurang dari 10. Sedangkan asam amino yang sama antara kompleks AKT-IQO adalah AKT-curcumenol yang menunjukkan 4 asam amino yang sama yaitu Leu264, Trp80, Val270, Ile84. *Binding affinity* paling kuat adalah AKT yang berikatan dengan demetoxycurcumin yaitu sebesar -9,9Kkal/mol. Namun senyawa curcumenol memiliki 4 asam amino yang sama dengan posisi ligan unik IQO, yang menunjukkan curcumenol memiliki kemiripan dengan IQO, berpotensi lebih baik dalam menghambat protein AKT.

## KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa secara *in silico* menggunakan metode *docking* antara protein AKT didapatkan senyawa aktif dari ekstrak kasar Kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) yaitu demethoxycurcumin yang dapat menghambat aktivitas protein. Hambatan AKT dapat menghambat proliferasi sel, sehingga potensial dalam target sel kanker.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Wijaya Kusuma Surabaya sebagai penyandang dana penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adami, G., Pontalti, M., Cattani, G., Rossini, M., Viapiana, O., Orsolini, G., Benini, C., Bertoldo, E., Fracassi, E., Gatti, D., & Fassio, A. (2022). Association between long-term exposure to air pollution and immune-mediated diseases: A population-based cohort study. *RMD Open*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-002055>
- Adeshakin, F. O., Adeshakin, A. O., Afolabi, L. O., Yan, D., Zhang, G., & Wan, X. (2021). Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming. *Frontiers in Oncology*, 11(March), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626577>
- Ahmed Hamdi, O. A., Syed Abdul Rahman, S. N., Awang, K., Abdul Wahab, N., Looi, C. Y., Thomas,

- N. F., & Abd Malek, S. N. (2014). Cytotoxic constituents from the rhizomes of curcuma zedoaria. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/321943>
- Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., & Lanni, C. (2018). Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and Echinacea. *Molecules*, 23(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23112778>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Oncotarget 7204 www.impactjournals.com/oncotarget Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
- Duan, L., Rao, X., & Sigdel, K. R. (2019). Regulation of inflammation in autoimmune disease. *Journal of Immunology Research*, 2019, 17–18. <https://doi.org/10.1155/2019/7403796>
- Govindammal, M., Prasath, M., Kamaraj, S., Muthu, S., & Selvapandiyan, M. (2021). Exploring the molecular structure, vibrational spectroscopic, quantum chemical calculation and molecular docking studies of curcumin: A potential PI3K/AKT uptake inhibitor. *Heliyon*, 7(4), e06646. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06646>
- He, W., Zhai, X., Su, J., Ye, R., Zheng, Y., & Su, S. (2019). Antiviral activity of germacrone against pseudorabies virus in vitro. *Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040258>
- Kaushik, M., & Jalalpure, S. (2011). Effect of Curcuma zedoaria Rosc root extracts on behavioral and radiology changes in arthritic rats. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(3), 170. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.85537>
- Kawade, V. S., Satpute, P. S., Dhulap, S. A., & Gurjar, S. (2018). Therapeutic potential of PI3K/Akt/mTOR signalling pathway: Effective combination therapy for cancer. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(4), 702–708. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000410>
- Mesaik, M. A., Jabeen, A., Halim, S. A., Begum, A., Khalid, A. S., Asif, M., Fatima, B., Ul-Haq, Z., & Choudhary, M. I. (2012). In Silico and In Vitro Immunomodulatory Studies on Compounds of Lindelofia stylosa. *Chemical Biology and Drug Design*, 79(3), 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01310.x>
- Shofi, M., Fakultas, B., Dan, T., Kesehatan, M., Ilmu, I., Bhakti, K., & Kediri, W. (2021). Analisis Senyawa  $\alpha$ -spinasterol Pada Biji Trembesi (Samanea saman (jacq.) Merr) Terhadap Penghambatan 3C-like Protease SARS-CoV-2 Melalui Uji In Silico Analysis of  $\alpha$ -spinasterol Compounds in Trembesi Seeds (Samanea saman (jacq.) Merr) Against Inhibition of. *Agustus*, 2(2), 74–88.
- Tania, P. O. A., Putri, C. R. H., Sanjaya, A., Sunaryati, T., Hartanto, D., Purnama, E. R., & Isnoviana, M. (1970). Anti-Proliferative Compound Candidate of White Turmeric (Curcuma zedoaria). *Jurnal Biota*, 9(2), 61–71. <https://doi.org/10.19109/biota.v9i2.13746>
- Xie, S., Chen, M., Yan, B., He, X., Chen, X., & Li, D. (2014). Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094496>
- Yu, F., He, K., Dong, X., Zhang, Z., Wang, F., Tang, Y., Chen, Y., & Ding, G. (2020). Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from Nibea japonica skin in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Journal of Functional Foods*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103888>
- Zhang, A., Yang, X., Li, Q., Yang, Y., Zhao, G., Wang, B., & Wu, D. (2018). Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from Cistanche deserticola as a plant adjuvant in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191356>
- Zhang, Y., Wang, X., Yang, H., Liu, H., Lu, Y., Han, L., & Liu, G. (2013). Kinase AKT controls innate immune cell development and function. *Immunology*, 140(2), 143–152. <https://doi.org/10.1111/imm.12123>