

Molecular Docking Kaempferol sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis secara *In Silico*

Molecular Docking Kaempferol as Anti-Inflammatory in Atherosclerosis in Silico

Gede Ngurah Hadi Candra^{1*}, I Made Adnyana Partha Wijaya¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Denpasar, Bali, Indonesia

Abstrak: Aterosklerosis digambarkan sebagai reaksi inflamasi kronis dari dinding pembuluh darah sebagai respons terhadap dislipidemia bersama dengan gangguan endotel termasuk penarikan leukosit dengan aktivasi sel vaskular lokal. Gangguan endotel merangsang produksi sitokin proinflamasi dimediasi oleh NF-κB sehingga mendukung terbentuknya plak ateroma. Flavonol daun kelor memiliki aktivitas dalam memperlambat kejadian inflamasi. Flavonol utama pada daun kelor adalah kaempferol. Pengujian aktivitas kaempferol sebagai anti-inflamasi aterosklerosis yang didasarkan interaksi protein NF-κB dengan metode *molecular docking*. Pengujian aktivitas dilaksanakan adalah penyiapan struktur protein NF-κB, persiapan protein dengan Chimera1.11.1, optimasi struktur 3D kaempferol dengan HyperChem 8, validasi metode *molecular docking* dan *docking* kaempferol pada protein NF-κB dengan *Autodock tools* 1.5.6. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kaempferol memiliki afinitas karena mampu membentuk ikatan hidrogen dengan protein NF-κB. Energi ikatan yang terbentuk antara kaempferol dengan protein NF-κB sebesar -7,85 kkal/mol yang membentuk ikatan hidrogen pada residu asam amino LEU472 dan SER476. Kaempferol mempunyai aktivitas sebagai anti-aterosklerosis karena memiliki afinitas dengan protein NF-κB yang dapat menghambat proses inflamasi terbentuknya plak ateroma.

Kata Kunci: anti-aterosklerosis, *in silico*, kaempferol, *molecular docking*

Abstract: Atherosclerosis is described as a chronic inflammatory reaction of the blood vessel walls in response to dyslipidemia along with endothelial disorders including leukocyte withdrawal with local vascular cell activation. Endothelial disruption stimulates the production of proinflammatory cytokines mediated by NF-κB thereby promoting atheroma plaque formation. Moringa leaf flavonols have activity in slowing down inflammatory events. The main flavonol in Moringa leaves is kaempferol. Testing kaempferol activity as an anti-inflammatory atherosclerosis based on the interaction of NF-κB protein with the molecular docking method. The activity tests carried out were the preparation of the NF-κB protein structure, protein preparation with Chimera1.11.1, optimization of the 3D structure of kaempferol with HyperChem 8, validation of the molecular docking method and kaempferol docking on NF-κB protein with Autodock tools 1.5.6. The results showed that kaempferol has an affinity because it is able to form hydrogen bonds with NF-κB protein. The bond energy formed between kaempferol and NF-κB protein is -7.85 kcal / mol which forms hydrogen bonds on the amino acid residues LEU472 and SER476. Kaempferol has anti-atherosclerosis activity because it has affinity with the NF-κB protein which can inhibit the inflammatory process from forming atheroma plaques.

Keywords: anti-atherosclerosis, *in silico*, kaempferol, molecular docking.

PENDAHULUAN

Penyakit Jantung Koroner (PJK) masih menjadi problem kesehatan besar baik di negara maju dan berkembang. PJK masih menjadi penyebab kematian utama di Indonesia dan diperkirakan menjadi penyebab kematian di seluruh dunia sebesar 30% (Zahrawardani dkk.,

2013). Tiga perempat dari total kematian akibat penyakit jantung koroner ditemukan pada masyarakat di negara berpenghasilan rendah dan menengah (Gaziano *et al.*, 2010). Diperkirakan tahun 2030 angka mortalitas akibat PJK akan meningkat hingga 23,3 juta (Ghani dkk., 2016).

* email korespondensi: gedengurahhadicandra@gmail.com

Aterosklerosis merupakan penyebab utama pada PJK (Themistocleus *et al.*, 2017).

Aterosklerosis digambarkan sebagai reaksi inflamasi kronis dari dinding pembuluh darah sebagai respons terhadap dislipidemia bersama dengan gangguan endotel termasuk penarikan leukosit dengan aktivasi sel vaskular lokal (Qahtany *et al.*, 2018). Cedera endotel berperan sebagai pemicu aterosklerosis. Aliran darah yang turbulenta menyebabkan disfungsi endotel, menghambat produksi NO, vasodilator yang kuat dan merangsang produksi sitokin proinflamasi berupa molekul adhesi yang menarik sel-sel inflamasi. Hasil akhir adalah monosit dan sel T mengikat ke sel endotel dan bermigrasi ke ruang subendotel. Lipid dalam darah, LDL, VLDL berikatan dengan sel endotel dan teroksidasi di ruang subendotel. Monosit di ruang subendotel berubah menjadi makrofag menelan LDL teroksidasi dan berubah menjadi sel busa yang akan membentuk plak aterosklerotik (Aziz and Yadav, 2016).

Sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6 disekresikan oleh makrofag, limfosit, *natural killer cell*, dan sel otot polos pembuluh darah. Sinyal faktor nekrosis tumor- α dan IL-1 dimediasi oleh faktor nuklir *kappa-light-chain-enhancer* dari jalur sel B (NF- κ B) yang aktif (Tousoulis *et al.*, 2016). Aktivasi NF κ B mengontrol mediator yang mengatur potensi trombotik dari plak aterosklerotik manusia termasuk faktor jaringan (TF), metaloproteinase matriks (MMPs), dan sitokin inflamasi (Pamukcu *et al.*, 2011). Hal ini mempengaruhi hampir sel yang terlibat dalam proses aterosklerosis dengan mendorong ekspresi sitokin, molekul adhesi, dan migrasi serta mitogenesis otot polos pembuluh darah dan sel endotel. Didasarkan proses terjadinya plak, maka dilaksanakan pengujian mengenai pengembangan obat aterosklerosis dengan mencegah pembentukan plak melalui proses penghambatan inflamasi.

Flavonoid merupakan senyawa yang digunakan sebagai komponen aktif fisiologis utama untuk mengobati penyakit manusia. Salah satunya flavonol (quercetin, kaempferol, dan myricetin) telah dilaporkan menunjukkan berbagai fungsi

biologis dan khasiat obat seperti antioksidan, antitrombotik, anti inflamasi, efek anti aterogenik, anti-aterosklerotik, dan kardioprotektif (Salvamani *et al.*, 2014). Kandungan flavonol utama adalah kaempferol yang mana dapat menghambat proses inflamasi (Rajanadh *et al.*, 2012). Oleh karena itu, penting melakukan pengujian untuk mengetahui potensi kaempferol sebagai anti-inflamasi pada aterosklerosis didasarkan interaksi protein NF- κ B dengan metode *molecular docking*. Penggunaan cara ini dilakukan untuk mengetahui ikatan senyawa uji dan interaksi yang dapat terbentuk. Oleh karena itu cara ini dapat memprediksi potensi kaempferol anti-inflamasi pada pembentukan plak.

METODE PENELITIAN

Bahan. Protein NF- κ B (pdb id: 4IDV) yang digunakan dalam penelitian ini diunduh dari <https://www.rcsb.org/pdb/home> dan struktur 3D kaempferol dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol>

Alat. Alat yang digunakan untuk uji *in silico* adalah komputer yang memiliki spesifikasi Windows 10 64 bit. Program untuk docking molekular adalah *AutoDock Tools* 1.5.6, *Chimera* 1.11.1 untuk preparasi protein, dan *HyperChem* 8 untuk preparasi serta optimasi senyawa uji.

Preparasi Protein NF- κ B. Tahap penyiapan protein NF- κ B kemudian dipisahkan bagian *native ligand*-nya dari protein menggunakan program *Chimera* 1.11.1.

Validasi Metode *Molecular Docking*. Proses validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan *redocking* antara *native ligand* yang telah dipisahkan dari protein target dengan program *Autodock Tools* 1.5.6. Validitas metode ini dinyatakan valid dengan parameter nilai RMSD (*root mean square distance*) $\leq 3 \text{ \AA}$ (Jain and Nicholls, 2008). Nilai ini dicapai dengan melakukan pengaturan *grid box* pada proses validasi sehingga diperoleh nilai RMSD yang diterima.

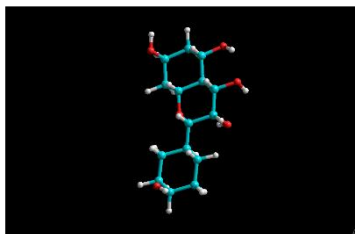
Optimasi Struktur 3D Kaempferol. Senyawa uji kaempferol dengan bentuk struktur 3D dioptimasi dengan program *HyperChem 8* menggunakan metode semi-empiris AM1 serta dilakukan kalkulasi single point serta optimasi geometri untuk mendapatkan struktur senyawa uji yang lebih stabil ditandai dengan energi total ikatan yang lebih rendah.

Docking Kaempferol pada Protein NF-κB. Senyawa uji kaempferol yang telah dioptimasi kemudian di-*docking*-kan dengan protein NF-κB tanpa *native ligand*-nya menggunakan *Autodock tools 1.5.6*. Proses docking ini menggunakan grid box hasil validasi metode yang telah valid.

Analisis Data. Hasil energi ikatan yang dihasilkan berupa nilai energi ikatan yang memperlihatkan ikatan antara senyawa uji dengan protein target. Semakin negatif energi suatu ikatan yang dihasilkan menunjukkan bahwa semakin kuat dan stabil ikatan yang terjadi antara senyawa uji dengan protein target. Interaksi yang terjadi dapat dilihat dari jenis ikatan yang terbentuk serta visualisasi docking antara kaempferol dengan protein target.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Struktur 3D kaempferol dioptimasi menggunakan *HyperChem 8*. Gambar struktur kaempferol yang teroptimasi ditampilkan di **Gambar 1**.



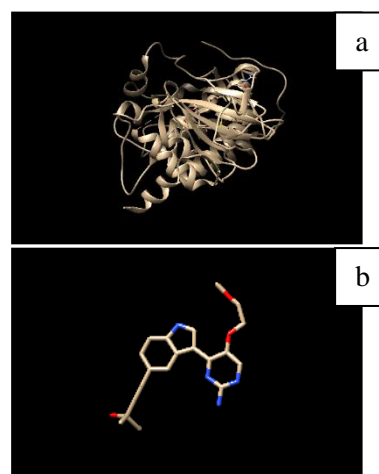
Gambar 1. Struktur Tiga Dimensi Kaempferol Teroptimasi.

Optimasi struktur 3D kaempferol diawali dengan kalkulasi *single point* untuk mengetahui energi awal dari struktur 3D kaempferol. Perolehan energi pada perhitungan *single point* kaempferol

adalah -3921,066884 kkal/mol. Kemudian dilanjutkan dengan optimasi geometri yang mana untuk mengurangi energi sehingga memperoleh struktur kaempferol yang lebih stabil dengan ditandainya penurunan nilai energi total struktur 3D kaempferol menjadi -4607,3935 kkal/mol (Fitrisari dkk., 2008).

Preparasi Struktur 3D Protein Target

Protein NF-κB mempunyai empat rantai antara lain A, B, C, dan D. Inhibitor *native ligand* protein NF-κB adalah 4-{3-[2-amino-5-(2-methoxyethoxy) pyrimidin-4-yl]-1H-indol-5-yl}-2-methylbut-3-yn-2-ol (13V) yang terletak di seluruh rantai protein NF-κB dan rantai A digunakan dalam persiapan protein NF-κB pada pengujian ini. Struktur protein NF-κB dan *native ligand* yang sudah terpisah ditampilkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. (a) Struktur Rantai Protein NF-κB Tanpa *Native Ligand*; (b) *Native Ligand* Protein NF-κB.

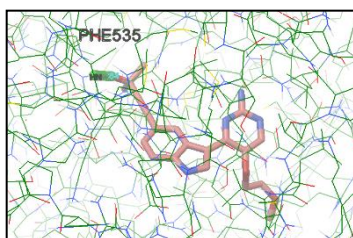
Persiapan protein NF-κB dikerjakan melalui pemisahan protein dengan *native ligand* sehingga terdapat ruang yang akan dimanfaatkan untuk *molecular docking* kaempferol. Persiapan dilakukan pada protein NF-κB dengan rantai A. Selain itu, dilakukan eliminasi dari molekul air (H₂O) disekeliling struktur protein yang bertujuan untuk H₂O tidak mengacaukan pelaksanaan *docking* sehingga dipastikan yang berinteraksi hanya ligan dengan protein (Tiahiono dan Hamzah, 2013). *Output* proses preparasi protein adalah struktur protein tanpa *native ligand* dan *native ligand* yang disimpan dalam bentuk file pdb.

Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode *molecular docking* dilaksanakan dengan *redocking* protein NF- κ B tanpa *ligand* dengan *native ligand* menggunakan program *Autodock tools* 1.5.6. Hasil dan tampilan interaksi validasi metode dapat dilihat pada **Tabel 1** dan **Gambar 3**.

Tabel 1. Hasil Validasi Metode *Molecular Docking*.

Ligand	Energi Ikatan (kkal/mol)	RMSD (Å)	Ikatan Hidrogen	Gugus
<i>Native Ligand</i>	-9,86	0,61	PHE535 GLU470	N3-O HN-O1



Gambar 3. Visualisasi Interaksi antara protein NF- κ B dengan *native ligand*.

Validitas metode dilihat dari nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) merupakan nilai penyimpangan dari posisi ikatan *native ligand* dengan protein setelah di-*docking*-kan terhadap posisi ikatan *native ligand* yang sebenarnya (Lestari, 2015). Nilai RMSD ≤ 3 Å menjadi parameter validasi pada metode ini, sehingga dari hasil *redocking* menunjukkan bahwa metode telah valid dan mendekati konformasi yang sebenarnya (Jain and Nicholls, 2008). Semakin negatif nilai RMSD menunjukkan bahwa *pose* ligan yang diprediksi semakin baik karena semakin mendekati konformasi *native ligand*. Sebaliknya, semakin besar nilai RMSD menunjukkan bahwa semakin besar perbedaan konformasi antara *pose* ligan yang diprediksi dengan *native ligand* setelah dilakukan *redocking* sehingga semakin besar pula kesalahan prediksi interaksi antara ligan dengan protein tersebut (Agistia dkk., 2013).

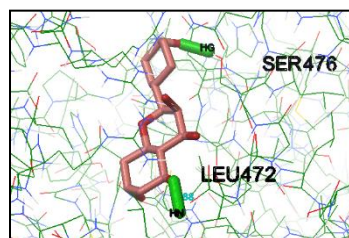
Hasil validasi metode menghasilkan nilai RMSD ≤ 3 Å yaitu 0,61 Å sehingga metode yang digunakan pada penelitian ini dinyatakan telah valid sehingga pengaturan *grid box* yaitu koordinat ruang tempat senyawa uji dan protein berikatan dapat digunakan pada proses *docking* senyawa uji kaempferol dengan protein target.

Docking Kaempferol pada Protein NF- κ B

Docking kaempferol pada protein target NF- κ B menggunakan program *Autodock tools* 1.5.6. Pengaturan koordinat *grid box docking* sama dengan koordinat *grid box* pada proses validasi. Hasil yang didapatkan yaitu energi ikatan dan jenis ikatan yang terbentuk pada konformasi tertentu. Semakin negatif nilai energi ikatan yang terbentuk maka senyawa uji memiliki afinitas dengan protein targetnya dengan lebih stabil. *Output* dan tampilan *docking* terlampir pada **Tabel 2** dan **Gambar 4**.

Tabel 2. *Output docking* kaempferol dengan protein NF- κ B.

Ligand	Energi Ikatan (kkal/mol)	Ikatan Hidrogen	Gugus
Kaempferol	-7,85	LEU472 SER476	HN-O HG-O



Gambar 4. Visualisasi Interaksi antara protein NF- κ B dengan kaempferol.

Potensi afinitas dari kaempferol terhadap protein target dapat diketahui melalui perbandingan energi ikatan yang terbentuk antara kaempferol dengan protein target terhadap energi ikatan antara *native ligand* dengan protein target. Energi ikatan *native ligand* pada protein target digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif untuk menentukan kestabilan dan kekuatan ikatan yang terbentuk.

Docking kaempferol pada sisi aktif dari protein NF- κ B. *Docking* menghasilkan data energi ikatan dan visualisasi interaksi pada 10 konformasi terbaik. Nilai energi ikatan yang dihasilkan bernilai negatif menunjukkan afinitas antara kaempferol dengan protein tersebut. Nilai energi ikatan yang semakin negatif maka semakin stabil dan kuat ikatan dan afinitas yang terbentuk (Laksmiani dkk., 2016). Energi ikatan antara kaempferol dengan protein NF- κ B sebesar -7,85 kkal/mol yang

membentuk ikatan hidrogen pada residu asam amino LEU472 dan SER476. Walaupun nilai energi kaempferol lebih positif dari energi *native ligand* pada proses validasi, kaempferol tetap memiliki afinitas pada protein NF- κ B karena telah mampu berinteraksi pada sisi aktif protein tersebut. Hasil visualisasi residu asam amino yang diperoleh juga berbeda dengan residu asam amino pada proses validasi. Hal ini disebabkan karena suatu senyawa akan mencari posisi atau konformasi yang paling stabil pada sisi aktif protein target.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, senyawa kaempferol memiliki aktivitas anti-aterosklerosis karena memiliki afinitas terhadap protein NF- κ B. Afinitas yang terjadi antara kaempferol terhadap protein NF- κ B mampu menghambat transkripsi dari gen-gen proinflamasi sehingga terbentuknya plak aterosklerosis pada bagian dinding pembuluh darah dapat dihambat.

SIMPULAN

Kaempferol mempunyai aktivitas sebagai anti-aterosklerosis karena mampu membentuk ikatan hidrogen sehingga memiliki afinitas terhadap protein NF- κ B yang mampu mencegah inflamasi dalam proses pembentukan plak atheroma menggunakan metode *molecular docking* secara *in silico*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ungkapan terima kasih untuk seluruh pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Agistia, D. D., Purnomo, H., Tegar, M., and Nugroho, A. E. (2013). Interaksi Senyawa Aktif dari *Aegle marmelos* Correa sebagai Anti Inflamasi dengan Reseptor COX-1 dan COX-2. *Traditional Medicine Journal*, 18, 80-87.

Aziz, M. and Yadav, K. S. (2016). Pathogenesis of Atherosclerosis A Review. *Medical & Clinical Reviews*, 2(3), 1 – 6.

Fitriasari, A., N. Wijayanti, K., Ismiyati, N., Dewi, D., Kundarto, W., Sudarmanto, B. S. A., and Meiyanto, E. (2008). Studi Potensi Kurkumin dan Analognya sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERMs): Docking pada Reseptor Estrogen β . *Pharmacol*, 9, 27-32.

Gaziano, T. A., Bitton, A., Anand, S., Abraham-Gessel, S., and Murphy, A. (2010). Growing Epidemic of Coronary Heart Disease in Low- and Middle-Income Countries. *Curr Probl Cardiol*, 35(2), 72-115.

Ghani, L., Susilawati, M. D., and Novriani, H. (2016). Dominant Risk Factors of Coronary Heart Disease in Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 44(3), 153-164.

Jain, A. N. and Nicholls, A. (2008). Recommendation for Evaluation of Computational Methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 22, 133- 139.

Laksmiani, N. P. L., Paramita, N. L. P. V., and Wirasuta, I. M. A. G. (2016). In Vitro and In Silico Antioxidant Activity of Purified Fractions from Purple Sweet Potato Ethanolic Extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 177-181.

Lestari, T. (2015). Studi Interaksi Senyawa Turunan 1,3-Dibenzoilthiourea sebagai Ribonukleotida Reduktase Inhibitor. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 7, 163-169.

Pamukcu, B., Lip, G. Y. H., and Shantsila, E. (2011). The nuclear factor – kappa B pathway in atherosclerosis: A potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thrombosis Research*, 128, 117 – 123.

Qahtany, A., Hani, F., Shali, H. A., Bayamin, A. A., Alzabien, H. S., Alrehaili, A. M., Aldalbahi, H. M. Z, Awadh, H. M. A., Yousif, M. M., Alqurashi, K. A., Aljehani, N. A., Alazwari, N. M., and Alghamdi, M. T. (2018). Atherosclerosis: Pathophysiology and Management. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 70, 82 – 87.

- Rajanandh, M. G., Satishkumar, M. N., Elango, K., and Suresh, B. (2012). *Moringa oleifera* Lam A herbal medicine for hyperlipidemia: a pre-clinical report. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(2), 790 – 795.
- Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shaharuddin, N. A., Ahmad, S. A., and Shukor, M. Y. (2014). Antiatherosclerotic Effect of Plant Flavonoids. *Biomed Research International*. 2014(480258), 1 – 11
- Themistocleous, I. –C, Stefanakis, M., and Douda, H. (2017). Coronary Heart Disease Part I: Pathophysiology and Risk Factors. *Journal of Physical Activity, Nutrition, and Rehabilitation*, April 29. 167 – 175.
- Tjahjono, D.H., dan Hamzah, N. (2013). Studi Hubungan Kuantitatif StrukturAktivitas, Fitur Farmakofor, dan Docking Molekuler Senyawa Turunan Pirazolo-[3,4-d]-Pirimidin sebagai Inhibitor Mer Tirosin Kinase. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 38(1), 1-10.
- Tousoulis, D., Oikonomou, E., Economou, E. K., Crea, F., and Kaski, J. C. (2016). Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches. *European Heart Journal*, 37(22), 1723 – 1732.
- Zahrawardani, D., Herlambang, K. S., and Anggraheny, H. D. (2013). Analisis Faktor Risiko Kejadian Penyakit Jantung Koroner di RSUP Dr Kariadi Semarang. *Jurnal Kedokteran Muhammadiyah*, 1(2), 13-20