

# PENENTUAN INHIBITOR SELEKTIF DALAM MENGHAMBAT KERJA ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2 dan EFEK MUTASI RESIDU ASAM AMINO SECARA IN SILICO

\*<sup>1</sup>Aga Adi Masyhuri

<sup>1</sup>Universitas dr. Soebandi Jember, Jl. dr. Soebandi No. 99 Patrang, Jember, Jawa Timur 68111, Indonesia

\*E-mail: [aga@uds.ac.id](mailto:aga@uds.ac.id)

Riwayat Article

Received: 10 February 2026; Received in Revision: 24 March 2026; Accepted: 30 March 2026

## Abstract

The development of selective inhibitors for Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymes is a strategic priority in molecular pharmacology to address the pathophysiology of inflammation without triggering gastrointestinal side effects. This report synthesizes research findings on the binding efficacy of four specific inhibitors—Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, and Etoricoxib—using an in-silico methodology based on AutoDock 4.0 docking algorithm. The primary finding reveals that Etoricoxib exhibits the highest selectivity with a ratio of 133, supported by molecular interactions at the methyl sulfone and pyridine groups. Residue mutation analysis identifies Tyrosine 385 (Y385) on COX-2 and Phenylalanine 518 (F518) on COX-1 as critical residues determining the dynamics of active site accessibility through catalytic volume change mechanisms. This report makes a significant contribution by validating computational methods as an accurate predictive tool for mapping ligand-receptor interactions on the COX-2 enzyme.

Keywords: COX-2, In Silico, Docking, Etoricoxib.

## Abstrak

Pengembangan inhibitor selektif terhadap enzim Siklooksigenase-2 (COX-2) merupakan prioritas strategis dalam farmakologi molekuler untuk mengatasi patofisiologi inflamasi tanpa memicu efek samping gastrointestinal. Laporan ini mensintesis temuan riset mengenai efikasi pengikatan empat inhibitor spesifik—Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, dan Etoricoxib—menggunakan metodologi in silico berbasis algoritma docking AutoDock 4.0. Temuan utama menunjukkan bahwa Etoricoxib memiliki tingkat selektivitas tertinggi dengan rasio 133, didukung oleh interaksi molekuler pada gugus metil sulfone dan pyridine. Analisis mutasi residu mengidentifikasi Tirosin 385 (Y385) pada COX-2 dan Fenilalanin 518 (F518) pada COX-1 sebagai residu kritis yang menentukan dinamika aksesibilitas sisi aktif melalui mekanisme perubahan volume ruang katalitik. Laporan ini memberikan kontribusi penting dalam memvalidasi metode komputasi sebagai instrumen prediktif yang akurat dalam memetakan interaksi ligan-reseptor pada enzim Siklooksigenase-2.

Keywords: COX-2, In Silico, Docking, Etoricoxib.

## 1. Introduction

Perkembangan metode komputasi dalam desain obat telah mengalami kemajuan pesat dan menjadi pendekatan penting dalam memprediksi interaksi molekul sebelum dilakukan uji eksperimental. Metode *in silico* seperti *molecular docking* memungkinkan evaluasi afinitas pengikatan ligan terhadap target protein secara efisien dan akurat (Khan et al., 2016; Devi et al., 2020). Selain itu, integrasi pendekatan komputasi modern seperti simulasi dinamika molekul dan analisis *binding free energy* semakin meningkatkan akurasi prediksi interaksi ligan-protein dalam pengembangan obat (Mishra et al., 2022; Kaur et al., 2021).

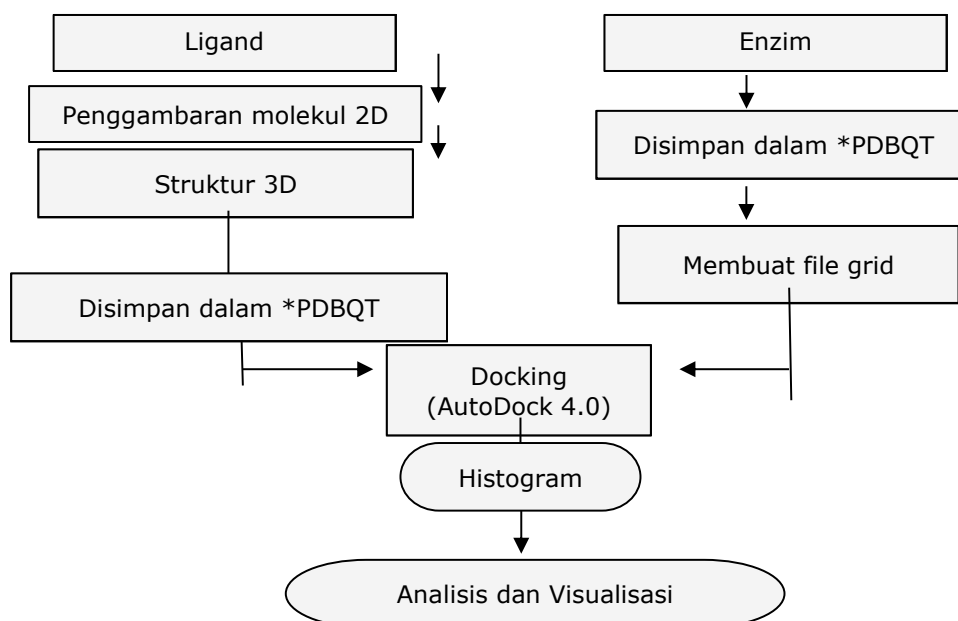
Enzim siklooksigenase (COX) memiliki dua isoform utama, yaitu COX-1 yang bersifat konstitutif dan berperan dalam menjaga homeostasis fisiologis, serta COX-2 yang diinduksi selama proses inflamasi (Abdel-Aziz et al., 2016). Oleh karena itu, pengembangan inhibitor selektif COX-2 menjadi strategi penting untuk mengurangi efek samping gastrointestinal yang sering ditimbulkan oleh NSAID non-selektif (Sharma et al., 2019). Studi terbaru juga menunjukkan bahwa pendekatan berbasis struktur (*structure-based drug design*) mampu meningkatkan selektivitas

inhibitor terhadap COX-2 melalui optimasi interaksi pada sisi aktif enzim (Yuniarti et al., 2023; Osman et al., 2024).

Sejumlah penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa senyawa seperti Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, dan Etoricoxib memiliki tingkat selektivitas yang berbeda terhadap COX-2, yang dipengaruhi oleh interaksi dengan residu aktif seperti Ser530 dan Tyr385 (Baek et al., 2018). Selain itu, pendekatan komputasi modern memungkinkan analisis struktur dan dinamika interaksi ligan-reseptor secara lebih mendalam, termasuk melalui simulasi docking dan dinamika molekul (Kaur et al., 2021; Mishra et al., 2022). Perkembangan terbaru juga menunjukkan bahwa desain senyawa berbasis farmakofor dan hibridisasi molekul dapat meningkatkan aktivitas antiinflamasi serta selektivitas terhadap COX-2 melalui interaksi spesifik dengan residu sisi aktif enzim (Osman et al., 2024; Yuniarti et al., 2023).

Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi tingkat selektivitas inhibitor COX-2 menggunakan metode *in silico* serta mengidentifikasi residu asam amino yang berperan penting dalam mekanisme pengikatan dan aktivitas katalitik enzim.

## 2. Methodology



Metodologi penelitian ini menerapkan metode komputasi (*in silico*) yang telah diakui sebagai standar efektif dalam desain obat modern berkat kemampuannya memprediksi afinitas pengikatan dengan akurasi tinggi sebelum tahapan sintesis laboratorium. Simulasi dilakukan dengan mengintegrasikan beberapa perangkat lunak spesialis, di antaranya Ghemical untuk pemodelan 3D dan optimasi geometri ligan, serta TRITON yang memanfaatkan engine MODELLER guna mengonstruksi struktur mutan protein secara akurat. Sebagai instrumen utama dalam simulasi docking molekuler, AutoDock 4.0 digunakan untuk menganalisis interaksi antara ligan dengan struktur kristal enzim yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB), yaitu kode 1CVU untuk enzim COX-2 dan 2OYU untuk COX-1.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Data Hasil Docking

Inhibitor	COX-1			COX-2		
	$\Delta G$ kkal/mol	$K_i (10^{-6})$	Probabilitas (%)	$\Delta G$ kkal/mol	$K_i (10^{-6})$	Probabilitas (%)
<i>Celecoxib</i>	-6.62	27.54	63	-8.02	1.30	100
<i>Rofecoxib</i>	-6.10	33.55	64	-8.71	0.41	99
<i>Etoricoxib</i>	-7.06	6.67	57	-9.54	0.05	100
<i>Valdecoxib</i>	-7.13	5.90	45	-9.94	0.10	100

**Table 1.** Hasil docking antara inhibitor dengan COX-1 dan COX-2

Keselektifan inhibitor terhadap enzim diuji dengan melakukan docking antara substrat dan keempat inhibitor, yaitu Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, Valdecoxib terhadap COX-1 dan COX-2. Mekanisme interaksi antara substrat dan inhibitor pada enzim COX-1 dan COX-2 berlangsung melalui kompetisi pada sisi aktif enzim, di mana dalam kondisi normal substrat berupa asam arakidonat akan berikatan dengan residu katalitik seperti Serin 530 dan Tirosin 385 membentuk kompleks enzim-substrat yang kemudian mengalami reaksi katalitik menghasilkan prostaglandin sebagai mediator inflamasi. Namun, ketika inhibitor seperti Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, dan Valdecoxib hadir, senyawa tersebut akan berikatan pada sisi aktif yang sama sehingga membentuk kompleks enzim-inhibitor yang bersifat kompetitif dan menghalangi akses substrat ke dalam enzim. Secara molekuler, inhibitor memiliki afinitas yang tinggi terhadap residu aktif dan pada COX-2 mampu menempati kantung sekunder (secondary pocket) yang tidak dimiliki COX-1, sehingga meningkatkan selektivitas dan kekuatan pengikatan ligan. Akibatnya, pembentukan kompleks enzim-substrat terhambat dan produksi prostaglandin menurun, yang pada akhirnya menghasilkan efek antiinflamasi, sebagaimana juga ditunjukkan dalam hasil simulasi docking yang mengidentifikasi residu-residu kunci dalam aktivitas katalitik enzim. Docking antara substrat dan inhibitor terhadap COX-1 dan COX-2 akan didapatkan hasil berupa konstanta inhibisi, dengan perhitungan menggunakan rumus:

$$\Delta G = RT \ln K_i$$

Dari persamaan diatas apabila energi bebas yang dihasilkan berbeda maka nilai  $K_i$  yang dihasilkan juga berbeda. Semakin rendah nilai dari  $G$  maka nilai  $K_i$  akan semakin besar. Untuk masing-masing docking yang dilakukan sehingga dapat diketahui inhibitor yang selektif terhadap COX-2. Hasil penelitian Reshmi *et al* (2006) Enzim COX-2 memiliki sisi aktif Serin 530 dan residu katalitik Arginin 120, Tyrosin 355, Tyrosin 385, Valin 523 dan Histidin 90.

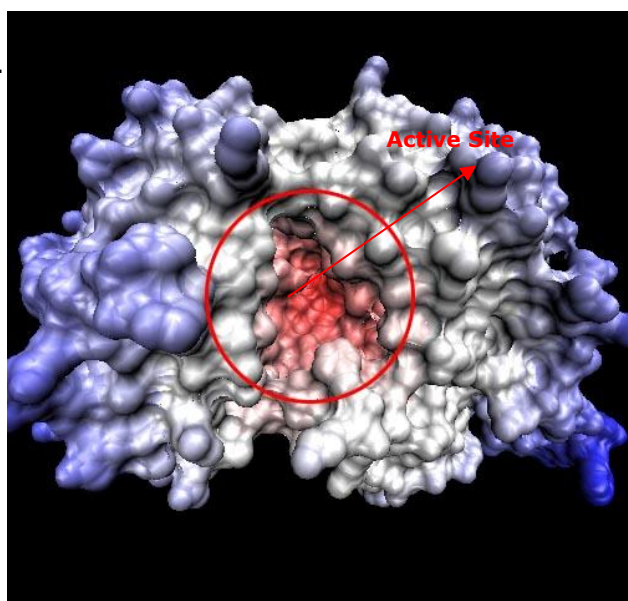
Inhibitor	Docking		Rasio keselektifan COX-2	Penelitian Mardini <i>et al</i> (2001)		Rasio keselektif an COX-2
	COX-1 ( $K_i$ ) $10^{-6}$	COX-2 ( $K_i$ ) $10^{-6}$		COX-1 ( $\mu M$ )	COX-2 ( $\mu M$ )	
<i>Celecoxib</i>	27.54	1.30	21	6.7	0.87	7.6
<i>Rofecoxib</i>	33.55	0.41	81	18.8	0.53	35
<i>Etoricoxib</i>	6.67	0.05	133	116	1.1	106
<i>Valdecoxib</i>	5.90	0.10	59	26.1	0.87	30

**Table 2.** Perbandingan hasil docking COX-1 dan COX-2 dengan penelitian Mardini *et al* (2001) yang menggunakan metode pengujian darah

Cara untuk menentukan keselektifan inhibitor terhadap COX-2 ditentukan berdasarkan rasio perbandingan antara COX-1 dengan COX-2 sehingga didapatkan rasio keselektifan Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, Valdecoxib terhadap COX-2 berturut turut sebesar 21, 81, 133, 59, sehingga dari rasio keselektifan itu kita bisa menentukan dari keempat inhibitor tersebut yang

merupakan inhibitor yang selektif terhadap COX-2. Hasil yang sama juga diperoleh dari penelitian Mardini et al (2001) yang menggunakan metode pengujian darah yaitu untuk menentukan inhibitor yang selektif terhadap COX-2 menggunakan konsentrasi dari inhibitor untuk menghambat laju dari enzim COX sebesar 50 persen pada COX-1 dan 50 persen pada COX-2. Pada penelitiannya itu Mardini et al (2001) juga mendapatkan Etoricoxib sebagai inhibitor yang paling selektif terhadap COX-2. Dari data hasil docking, Etoricoxib merupakan inhibitor yang paling selektif dibandingkan dengan ketiga inhibitor yang lain. Etoricoxib memiliki keselektifan enam kali lebih selektif daripada Celecoxib, satu setengah kali lebih selektif daripada Rofecoxib dan dua kali lebih selektif daripada Valdecoxib

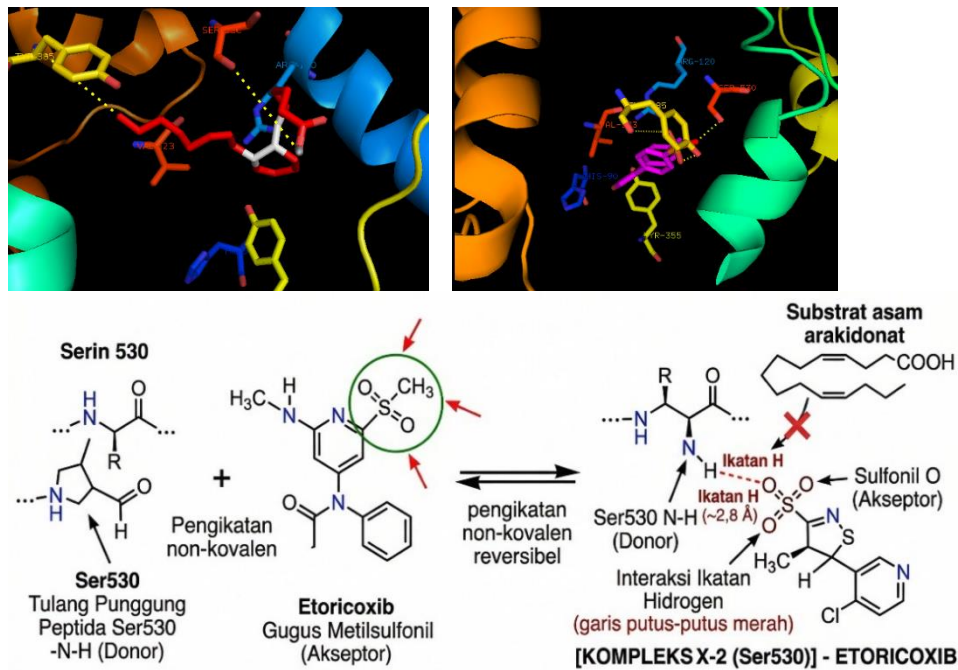
Sisi aktif enzim COX-2 ditunjukkan oleh gambar 1. Sedangkan menurut Harman *et al* (2007) Enzim COX-1 memiliki sisi aktif Serin 516 dan residu katalitik Isoleusin 517, Fenilalanin 518, Isoleusin 523, Glisin 192. Nilai probabilitas yang mencapai 100% pada interaksi COX-2 menunjukkan konvergensi hasil simulasi menuju satu kluster konformasi tunggal yang sangat stabil, menandakan tingkat kepercayaan hasil yang tinggi. Semakin tinggi nilai konstanta inhibisi ( $K_i$ ) maka kompleks inhibitor enzim akan semakin cepat terbentuk atau dengan kata lain inhibisi inhibitor terhadap enzim akan semakin bagus jika konstanta inhibisi ( $K_i$ ) nilainya besar jika dibandingkan dengan inhibisi inhibitor terhadap enzim yang nilai konstanta inhibisi ( $K_i$ ) yang nilainya kecil



**Figure 1.** Sisi Aktif Siklooksigenase-2

### 3.2. Evaluasi Diferensiator Utama: Etoricoxib

Etoricoxib menunjukkan performa selektivitas yang paling superior dengan rasio selektivitas mencapai 133. Hal ini secara struktural dimungkinkan oleh keberadaan gugus metil sulfone ( $\text{SO}_2\text{CH}_3$ ) dan pyridine. Berbeda dengan inhibitor lainnya, gugus metil sulfone pada Etoricoxib bertindak sebagai farmakofor spesifik yang mampu berinteraksi dengan kantung sekunder (secondary pocket) pada COX-2. Kantung ini bersifat hidrofilik, yaitu sifat suatu zat atau molekul yang mudah berinteraksi terhadap air. dan dibentuk oleh residu Valine 523 pada COX-2. Pada COX-1, posisi ini ditempati oleh residu Isoleusin yang lebih besar (bulky), sehingga menghalangi akses inhibitor ke kantung tersebut dan membatasi afinitas pengikatan ligan.



**Figure 2.** Model Pengikatan Etoricoxib dengan Sisi Aktif Serin 530 pada Siklooksigenase-2

Gambar 2 menunjukkan adanya ikatan hydrogen antara gugus karboksilat substrat dengan gugus NH dari serin 530, selain itu gugus metil dari substrat juga berikatan hydrogen dengan Tyrosin 385, adanya ikatan hydrogen antara gugus metil sulfonil dari Etoricoxib dengan gugus NH dari serin 530 yang merupakan sisi aktif enzim. Etoricoxib merupakan inhibitor yang bersifat reversible kompetitif (Black 2004) itu berarti dalam menghambat enzim Etoricoxib ini berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim

### 3.3. Validasi Hasil Docking dibanding experimental

Validasi dilakukan dengan membandingkan rasio selektivitas hasil simulasi dengan data literatur eksperimental pengujian darah (Mardini *et al.*, 2001)

Inhibitor	Rasio Selektivitas ( <i>In Silico</i> )	Rasio Selektivitas (Mardini <i>et al.</i> , 2001)
Celecoxib	21	7.6
Rofecoxib	81	35
Valdecoxib	59	30
<b>Etoricoxib</b>	<b>133</b>	<b>106</b>

**Table 2.** Perbandingan hasil docking COX-1 dan COX-2 dengan penelitian Mardini *et al* (2001) yang menggunakan metode pengujian darah

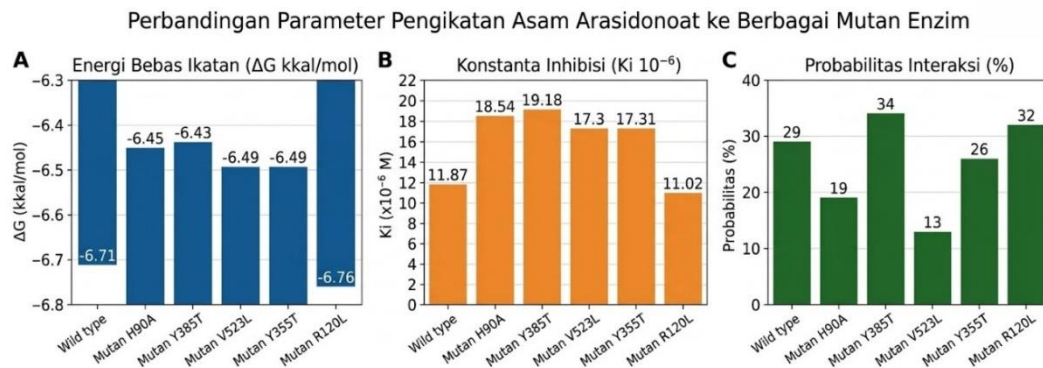
Meskipun terdapat variasi nilai absolut, tren selektivitas menunjukkan konsistensi yang sangat kuat, di mana Etoricoxib tetap memegang posisi sebagai inhibitor yang paling selektif. Sementara afinitas pengikatan menetapkan potensi ligan, pemahaman mengenai kontribusi residu asam amino spesifik melalui studi mutasi *in silico* sangat penting untuk mengonfirmasi residu katalitik yang bertanggung jawab atas selektivitas ini.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini mendukung penggunaan metode *in silico* sebagai alat yang efektif dalam desain obat modern, khususnya dalam mengidentifikasi inhibitor selektif COX-2 dengan potensi aktivitas antiinflamasi yang tinggi (Khan *et al.*, 2016; El-Seedi *et al.*, 2019).

### 3.3. Analisis Efek Mutasi Residu Asam Amino

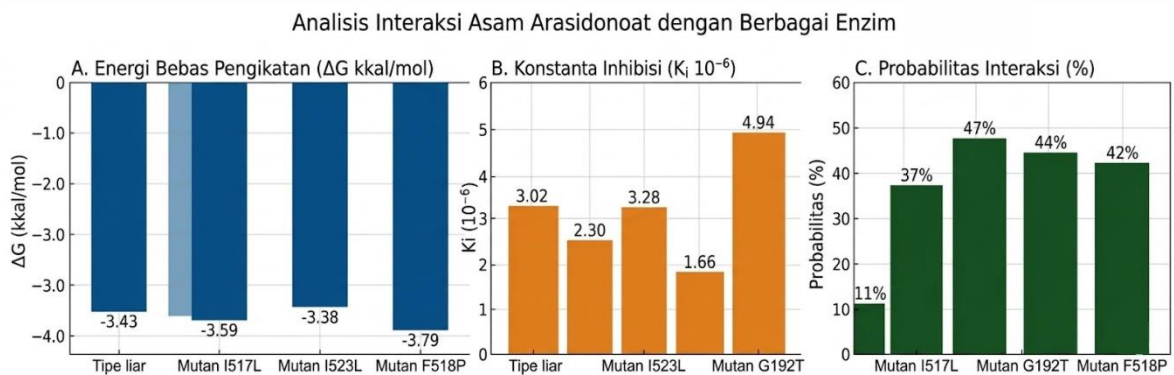
Asam Arasidonoat			
Enzim	$\Delta G$ kkal/mol	$K_i$ ( $10^{-6}$ )	Probabilitas (%)
Wild type	-6.71	11.87	29
Mutan H90A	-6.45	18.54	19
Mutan Y385T	-6.43	19.18	34
Mutan V523L	-6.49	17.3	13
Mutan Y355T	-6.49	17.31	26
Mutan R120L	-6.76	11.02	32

**Table 3.** Data hasil docking substrat pada COX-2



Asam Arasidonoat			
Enzim	$\Delta G$ kkal/mol	$K_i$ ( $10^{-6}$ )	Probabilitas (%)
Wild type	-3.43	3.02	11
Mutan I517L	-3.59	2.30	37
Mutan I523L	-3.38	3.28	47
Mutan G192T	-3.79	1.66	44
Mutan F518P	-3.14	4.94	42

**Table 4.** Data hasil docking substrat pada COX-1



Pada proses ini residu Enzim COX-1 dan COX-2 dimutasi dengan menggunakan program MODELLER. Tujuan yang diharapkan dari mutasi residu ini adalah untuk mengetahui residu yang paling berpengaruh pada enzim COX-1 dan COX-2. Residu Enzim COX-1 dan COX-2 disubstitusi dengan residu yang gugus R-nya memiliki sifat yang sama. Pada COX-1, residu Isoleusin disubstitusi dengan Leusin menghasilkan mutan I517 dan I523, Fenilalanin disubstitusi dengan Prolin menghasilkan mutan F518 dan Glisin disubstitusi dengan Threonin menghasilkan mutan G192. Sedangkan pada COX-2, residu Arginin disubstitusi dengan Lisin menghasilkan mutan R120, Tirosin disubstitusi dengan Threonin menghasilkan mutan Y385 dan Y355, Valin disubstitusi

dengan Leusin menghasilkan mutan V523 dan Histidin disubstitusi dengan Arginin menghasilkan mutan H90. Studi mutasi *in silico* memungkinkan peneliti membedah peran spesifik setiap residu dalam stabilitas sisi aktif secara murni tanpa gangguan variabel eksperimental yang kompleks. Melalui simulasi ini, ditemukan bahwa mutasi pada residu kritis menyebabkan perubahan nilai konstanta inhibisi yang signifikan, seperti pada COX-2 (Wild Type  $K_i$ : 11.87) dengan mutasi Y385T yang meningkatkan nilai  $K_i$  menjadi 19.18, serta pada COX-1 (Wild Type  $K_i$ : 3.02) dengan mutasi F518P yang menaikkan nilainya menjadi 4.94. Secara struktural, penggantian residu berukuran besar (bulky) seperti Tirosin 385 dan Fenilalanin 518 dengan asam amino yang lebih kecil (Threonin dan Prolin) secara efektif memperluas volume ruang katalitik serta saluran masuk sisi aktif, sehingga mempermudah aksesibilitas substrat dalam berikatan dengan enzim serta memberikan wawasan mendalam mengenai arsitektur pengikatan enzim tersebut.

#### 4. Conclusion

Berdasarkan hasil simulasi komputasi, Etoricoxib terbukti memiliki nilai strategis sebagai agen anti-inflamasi dengan profil keamanan gastrointestinal yang unggul berkat rasio selektivitas ekstrem sebesar 133, yang secara signifikan melampaui Rofecoxib, Valdecoxib, dan Celecoxib. Temuan ini didukung oleh identifikasi residu Tirosin 385 pada COX-2 dan Fenilalanin 518 pada COX-1 sebagai penentu utama volume serta aksesibilitas sisi aktif, serta divalidasi oleh konsistensi tren data *in silico* dengan hasil eksperimental terdahulu. Sebagai langkah pengembangan inhibitor generasi berikutnya, disarankan untuk melanjutkan studi menggunakan simulasi dinamika molekul guna mengevaluasi stabilitas kompleks dalam kondisi pelarut yang lebih nyata serta mempelajari mekanisme reaksi katalisis secara lebih dinamis.

#### References

- Abdel-Aziz, H. A., et al. (2016) 'Design, synthesis, and evaluation of selective COX-2 inhibitors', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, pp. 410–421.
- Baek, S. H., et al. (2018) 'Molecular docking and dynamics simulation of COX-2 inhibitors', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(14), pp. 3786–3797.
- Devi, R., et al. (2020) 'Computational approaches for selective COX-2 inhibitor design', *Current Drug Discovery Technologies*, 17(3), pp. 312–322.
- El-Seedi, H. R., et al. (2019) 'Natural products as selective COX-2 inhibitors', *Phytochemistry Reviews*, 18(6), pp. 1617–1640.
- Kaur, G., et al. (2021) 'Structure-based drug design of COX-2 inhibitors', *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 104, 107836.
- Khan, M. T. H., et al. (2016) 'Virtual screening and molecular docking studies of anti-inflammatory agents targeting COX-2', *Computational Biology and Chemistry*, 62, pp. 1–9.
- Mishra, A., et al. (2022) 'Molecular docking and ADMET analysis of COX-2 inhibitors', *Journal of Molecular Structure*, 1250, 131798.
- Mardini, L. A., et al. (2001). A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Journal Inflammation Research*.
- Osman, E. O., et al. (2024) 'New pyrazole–pyridazine hybrids as selective COX-2 inhibitors: design, molecular docking and *in silico* studies', *RSC Medicinal Chemistry*.
- Sharma, P., et al. (2019) 'Insights into COX-2 inhibition through molecular docking and dynamics simulation', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(6), pp. 2713–2724.
- Yuniarti, N., et al. (2023) 'In silico study of COX-2 selective inhibitors from natural compounds', *Indonesian Journal of Pharmacy*, 34(2), pp. 150–160.