

PENAPISAN VIRTUAL SENYAWA TURUNAN METIL SINAMAT PADA ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2)

Teni Ernawati

Pusat Penelitian Kimia-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Kawasan Puspiptek, Tangerang Selatan, Banten 15314
Telp; 021-7560929, Fax: 021-7560549
E-mail : teni001@lipi.go.id

ABSTRACT

Inflammation is the response of living tissue to vascular injury. Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) could control pain caused by inflammation. Therapeutic effects of NSAIDs are related to the mechanism of the cyclooxygenase-1 (COX-1) enzyme and the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme in inhibiting the production of prostaglandins. In this paper, we report the virtual screening of methyl cinnamate derivative compounds against the COX-2. All methyl cinnamate derivative compounds were molecular docking simulated using the Protein-Ligand ANT System (PLANTS) software with ZINC03814717 as the reference compound. From the results of virtual screening, it was obtained that derivative compounds of methyl cinnamate were predicted as active COX-2 inhibitors because they have ChemPLP score better than that of the reference compounds ZINC03814717. The compound of acid 3- (4-benzoylphenyl) propionate was predicted as having the best score of ChemPLP.

Keywords: *Non-Steroid Anti-Inflammatory (NSAID), virtual screening, enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2), methyl cinnamate derivative*

ABSTRAK

Radang adalah respon vaskuler dari jaringan hidup terhadap cedera. Obat Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) dapat mengontrol rasa sakit akibat inflamasi. Efek terapi dari obat AINS berhubungan dengan mekanisme kerja enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dan enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dalam menghambat produksi prostaglandin. Dalam tulisan ini, kami melaporkan penapisan virtual senyawa turunan metil sinamat COX-2. Terhadap senyawa-senyawa turunan metil sinamat ini dilakukan simulasi penambatan molekul menggunakan piranti lunak Protein-Ligan ANT System (PLANTS) dengan referensi senyawa ZINC03814717. Berdasarkan hasil penapisan virtual ini diperoleh 3 senyawa turunan metil sinamat yang diprediksi aktif sebagai inhibitor COX-2 karena memiliki nilai skor ChemPLP lebih baik dari senyawa referensi ZINC03814717. Senyawa asam 3-(4-benzoylphenyl) propionate memiliki nilai skor ChemPLP yang paling baik.

Kata kunci : Obat Anti Inflamasi Non Steroid (AINS), penapisan virtual, enzim siklooksigenase-2 (COX-2), senyawa turunan metil sinamat

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan manifestasi terjadinya kerusakan jaringan. Gejala inflamasi dapat dilihat antara lain dengan timbulnya rasa nyeri, bengkak, adanya radang, panas dan kemerahan. Untuk mengatasi rasa nyeri yang ada maka diperlukan obat untuk meredakan dan mengendalikannya. Obat Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) ternyata efektif dalam mengatasi dan mengurangi rasa nyeri akibat inflamasi. Dalam mekanisme kerjanya, AINS mampu menghambat sintesis prostaglandin. Dimulai dari perubahan fosfolipid menjadi asam arakidonat yang merupakan substrat bagi enzim prostaglandin endoperoxide synthase (PGHS; COX, cyclooxygenase) menjadi PGG₂, dan reduksi peroxidative PGG₂ menjadi PGH₂. Selanjutnya sebagai bahan baku prostaglandin, endoperoxide PGH₂ dirubah menjadi berbagai prostaglandin. COX-2 yang terdapat di dalam sel-sel imun, sel endotel pembuluh darah dan fibroblast sinovial, sangat mudah diinduksi oleh berbagai mekanisme, akan merubah PGH₂ menjadi PGE₂ yang berperan dalam kejadian inflamasi, nyeri dan demam. Oleh karena itu COX-2 dikenal sebagai enzim "inducible"⁽¹⁾. Dan COX-2 juga dikenal sebagai bentuk enzim yang berhubungan dengan peradangan karena menginduksi inflamasi⁽²⁾.

Obat AINS yang mampu menghambat produksi prostaglandin mempunyai struktur kimia yang heterogen dan berbeda di dalam farmakodinamikanya. Oleh karena itu obat AINS dapat dikelompokkan berdasarkan: 1). struktur kimia, 2). tingkat keasaman dan 3). ketersediaan awalnya (pro-drug/bukan) 4). Selektif COX-1 inhibitor dan COX-2 inhibitor. Khasiat obat AINS itu sendiri sangat ditentukan oleh kemampuannya menghambat sintesis prostaglandin melalui hambatan aktivitas COX. Dari berbagai uji klinik pada penderita osteoarthritis ditunjukkan bahwa AINS, baik yang selektif maupun yang non-selektif menghambat aktivitas COX-2 tetap memiliki khasiat dalam mengurangi rasa nyeri^(3,4). Namun, dari hasil penelitian yang ada sekarang, dapat disimpulkan bahwa semakin selektif obat AINS menghambat COX-1 semakin berkurang khasiatnya sebagai anti inflamasi, dan sebaliknya, semakin selektif obat AINS menghambat COX-2 maka akan semakin besar khasiatnya sebagai anti inflamasi⁽⁵⁾. Kami mencoba untuk mensintesis senyawa turunan metil sinamat yang memiliki aktivitas dalam menghambat produksi prostaglandin yang juga selektif dalam menghambat COX-2. Ada beberapa jalan dalam memodifikasi struktur dari senyawa metil sinamat agar bioaktivitas yang diharapkan dapat tercapai, antara lain: menambah gugus fungsi di daerah aromatik, menambah gugus fungsi di sekitar ikatan rangkap dua ataupun menambah/mengurangi gugus fungsi di daerah ester/karboksilat. Banyak gugus fungsi yang bisa ditambahkan dan banyak proses yang bisa dilakukan dalam modifikasi struktur metil

sinamat. Bila semua proses sintesis dilakukan, ini akan memakan waktu lama dan membutuhkan dana besar untuk melakukan eksperimental. Untuk menghemat waktu dan biaya, maka kami mencoba untuk melakukan penapisan virtual terhadap beberapa senyawa metil sinamat yang diduga memiliki aktivitas menghambat COX-2.

Dalam tulisan ini, kami mencoba melakukan penapisan virtual senyawa-senyawa turunan metil sinamat untuk disimulasikan pada penambatan molekul menggunakan piranti lunak Sistem Protein-Ligan ANT (PLANTS 1.1) terhadap enzim COX-2. Target sesungguhnya dari senyawa turunan metil sinamat adalah protein di dalam tubuh mahluk hidup. Untuk dapat berinteraksi dengan protein, senyawa turunan metil sinamat awalnya harus masuk ke dalam situs aktif/situs tambat dari proteinnya. Volume dan bentuk molekul dari senyawa turunan metil sinamat harus sesuai dengan volume dan bentuk situs proteinnya⁽⁶⁾. Bila tidak, molekul ini tidak bisa masuk. Begitu pula dengan gugusnya, harus sesuai dengan asam amino pada situs itu. Kesesuaian diantara protein dan ligannya disebut sebagai “Lock and Key”, dan agar kondisi ini tercapai, maka senyawa bioaktif (dalam hal ini, senyawa turunan metil sinamat) mengatur konformasi pada saat molekul ini tertambat dengan stabil dan akurat.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Senyawa inhibitor COX-2 referensi ZINC03814717 (Gambar 1) target virtual dan berkas konfigurasi tervalidasi untuk identifikasi inhibitor COX-2 dan struktur senyawa-senyawa turunan metil sinamat yang diujikan (Gambar 2)⁽⁷⁾.

Peralatan

Perangkat keras: Komputer dengan memori 2 GB dan prosesor Intel Core i3 M380 (4 prosesor) @ 2,53 GHz. Perangkat lunak: Sistem Operasi Ubuntu 10.04, Open Babel 2.2.3, BKchem 0.13.0, aplikasi preparasi ligan dan protein untuk penambatan molekul SPORES, aplikasi penambatan molekul Sistem Protein-Ligan ANT (PLANTS1.1), dan aplikasi visualisasi molekul PyMOL 1.2r1

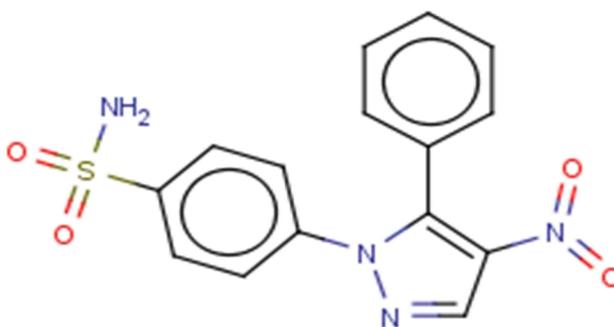
Metoda

Setiap senyawa turunan metil sinamat yang akan dilakukan penapisan virtual, dikonstruksi secara virtual dalam format dua dimensi (2D) dengan menggunakan aplikasi BKChem. Berkas luaran aplikasi BKChem diprotonasi pada pH 7.4 dan dikonstruksi struktur dalam bentuk tiga

dimensi (3D) menggunakan aplikasi Open Babel ⁽⁸⁾. Dengan aplikasi Open Babel pula, pada luaran dalam bentuk 3D ini dilakukan pencarian 10 konformer menggunakan metode simulasi Monte Carlo dan konformer dengan energi teroptimal diminimisasi dengan maksimal 1000 langkah dengan metode *steepest descent* ⁽⁸⁾. Struktur hasil optimasi ini dipreparasi menggunakan SPORES supaya siap sebagai masukan untuk simulasi penambatan molekul ⁽⁹⁾. Hasil preparasi ini kemudian menjadi berkas masukan untuk simulasi penambatan molekul menggunakan PLANTS 1.1 ⁽¹⁰⁾. Secara simultan juga dilakukan prosedur yang sama pada senyawa referensi ZINC03814717. Skor ChemPLP hasil penambatan ini dibandingkan dengan skor ChemPLP senyawa referensi ZINC03814717. Untuk mengetahui apakah skor ChemPLP senyawa uji lebih baik dibandingkan senyawa referensi ZINC03814717 dilakukan uji statistik *1-tailed t-test* berpasangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

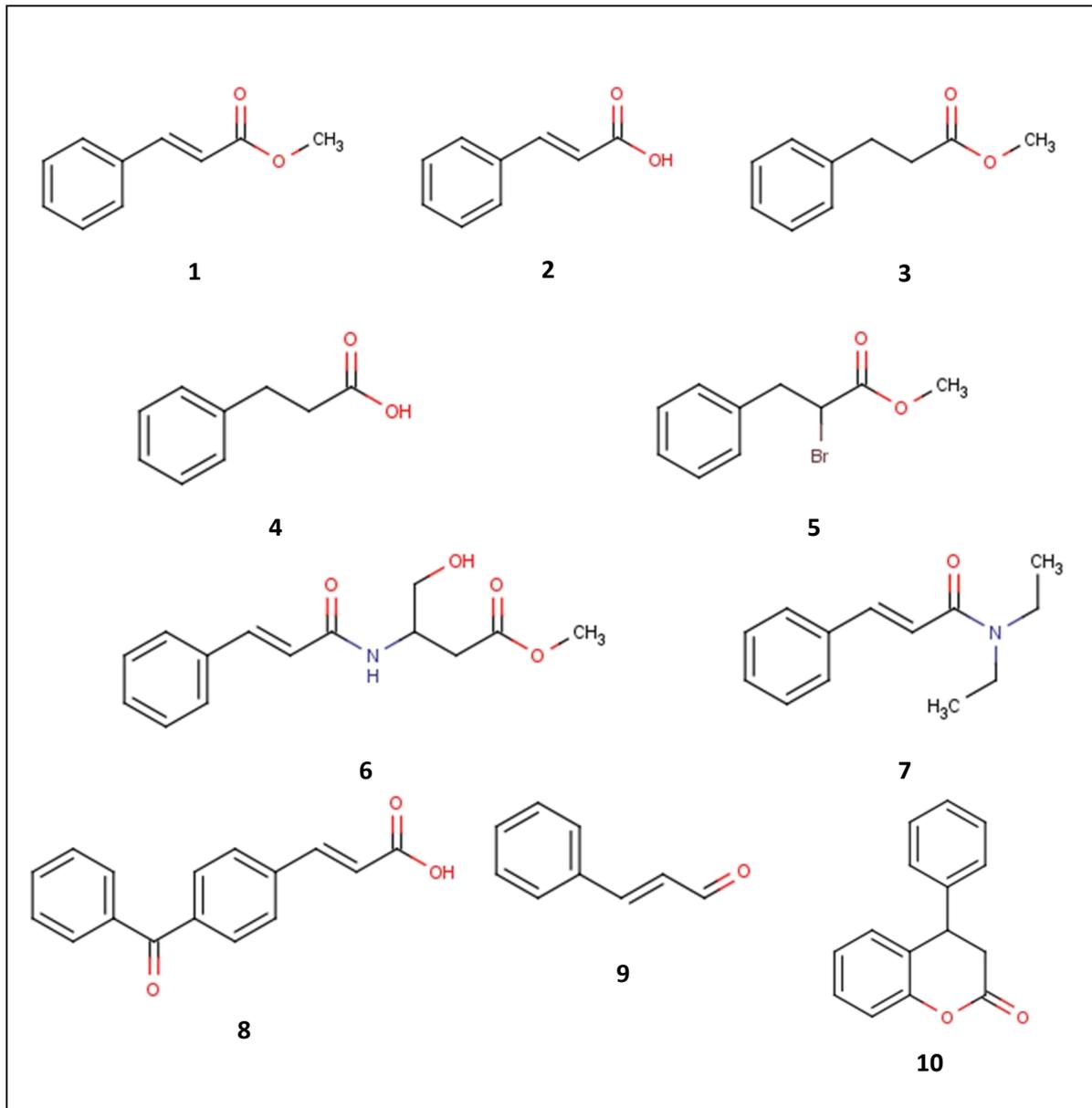
Pada penapisan virtual senyawa turunan metil sinamat ini, kami menggunakan senyawa tunggal ZINC03814717 sebagai senyawa referensi. Senyawa referensi ini dipilih karena dapat menunjukkan diskriminasi terbaik dibandingkan dengan inhibitor lainnya. Selain itu juga, senyawa ZINC03814717 telah dilaporkan sebagai inhibitor COX-2 dengan nilai IC_{50} COX-2 = 0,29 μ M atau pIC_{50} = 6,54, dimana IC_{50} COX-2 adalah besarnya konsentrasi inhibitor COX-2 yang dapat menghambat aktivitas COX-2 sebesar 50 % sedangkan pIC_{50} merupakan prediksi aktivitas biologis melalui simulasi docking ⁽¹¹⁾.



Gambar 1. Senyawa referensi ZINC03814717

Senyawa turunan metil sinamat yang disimulasikan terhadap enzim COX-2 adalah antara lain; metil sinamat, asam sinamat, metil 3-phenil propionat, asam 3-phenil propionat, metil 2-bromo-3-phenil propionat, metil 3-cinnamamido 4-hidroksi butanoat, N,N di-ethyl-

cinnamamide, asam 3-(4-benzoylphenyl) propionat, sinamaldehyd, dihidrokumarin. Semua struktur senyawa di atas dapat dilihat dalam Gambar 2.



Gambar 2. Senyawa-senyawa turunan Metil Sinamat yang diujikan terhadap enzim COX-2 (1) metil sinamat, (2) asam sinamat, (3) metil 3-phenil propionat, (4) asam 3-phenil propionat, (5) metil 2-bromo-3-phenil propionat, (6) metil 3-cinnamamido 4-hidroksi butanoat, (7) N,N di-ethyl-cinnamamide, (8) asam 3-(4-benzoylphenyl) propionat, (9) sinamaldehyd, (10) dihidrokumarin.

Hasil penapisan virtual senyawa turunan metil sinamat dapat dilihat pada Tabel 1. Dari tabel tersebut dapat diketahui nilai-nilai skor ChemPLP dari tiap tiap senyawa yang diuji

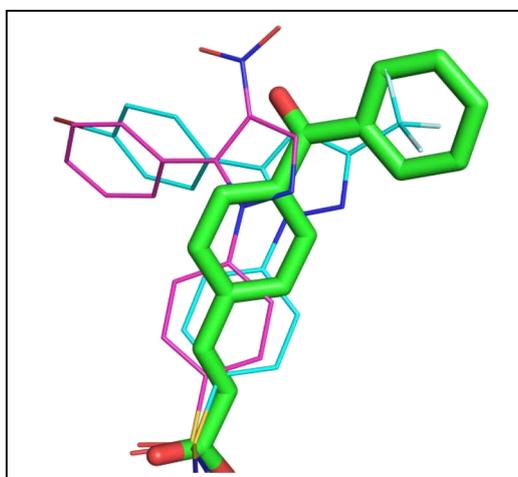
didapatkan bahwa senyawa 2, senyawa 4 dan senyawa 8 memiliki nilai skor ChemPLP lebih baik daripada senyawa referensi ZINC03814717. Senyawa 8, yaitu asam 3-(4-benzoylphenyl) propionat, memiliki nilai yang paling baik di antara semua senyawa turunan metil sinamat yang diujikan, ini berarti bahwa asam 3-(4-benzoylphenyl) propionat, dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai inhibitor COX-2.

Tabel 1. Hasil Penapisan Virtual senyawa turunan Metil Sinamat

Senyawa	Skor ChemPLP ^a		Prediksi ^b
	Senyawa Uji	Senyawa Referensi	
1	-79,972 ± 0,298	-89,889 ± 0,038	BUKAN INHIBITOR COX-2
2	-104,238 ± 0,180	-89,916 ± 0,055	INHIBITOR COX-2
3	-80,248 ± 0,062	-89,887 ± 0,069	BUKAN INHIBITOR COX-2
4	-102,954 ± 0,145	-89,939 ± 0,047	INHIBITOR COX-2
5	-76,616 ± 1,791	-89,932 ± 0,083	BUKAN INHIBITOR COX-2
6	-90,789 ± 1,167	-89,885 ± 0,084	BUKAN INHIBITOR COX-2
7	-75,049 ± 1,395	-89,958 ± 0,013	BUKAN INHIBITOR COX-2
8	-107,483 ± 1,093	-89,984 ± 0,050	INHIBITOR COX-2
9	-73,092 ± 0,070	-89,919 ± 0,029	BUKAN INHIBITOR COX-2
10	-80,524 ± 0,631	-89,932 ± 0,079	BUKAN INHIBITOR COX-2

^aNilai fungsi obyektif (purata ± SD dari 3 kali replikasi) dari aplikasi penambatan molekul yang digunakan. ^bSenyawa diprediksi aktif jika memiliki nilai skor ChemPLP senyawa uji lebih baik (lebih kecil) daripada senyawa referensi secara signifikan ($p < 0,05$) pada uji statistik *I-tailed t-test* berpasangan dengan tingkat kepercayaan 95%.

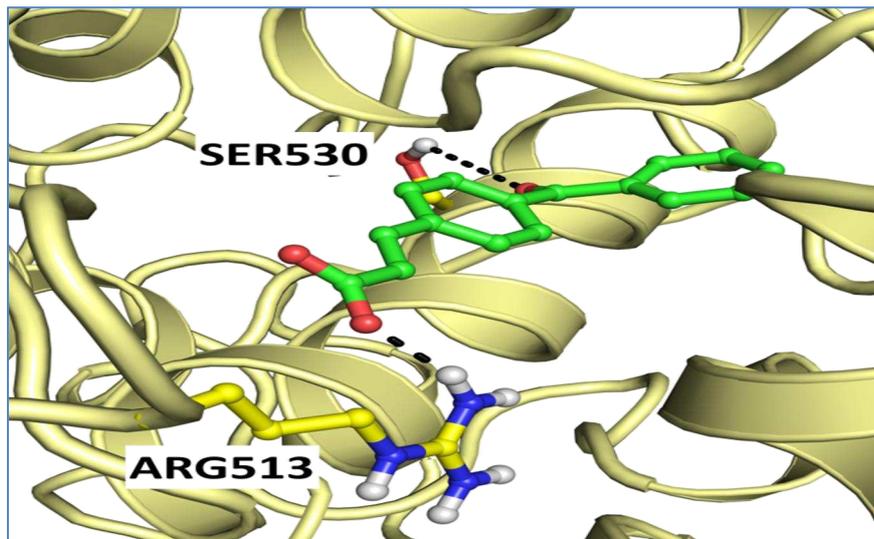
Dalam gambar 3 ditunjukkan superposisi hasil penambatan molekul senyawa 8 dengan hasil penambatan molekul senyawa S58 (senyawa ko-kristal pada kristal struktur COX-2 yang digunakan pada validasi protocol⁽¹²⁾) dan hasil penambatan molekul senyawa ZINC03814717 .



Gambar 3. Superposisi hasil penambatan molekul senyawa 8 di *binding pocket* COX-2 dengan hasil penambatan molekul S58 dan ZINC03814717

Interaksi senyawa 8 dengan beberapa residu asam amino yang berperan penting dalam penghambatan COX-2 (ARG513 dan SER530 ini merupakan residu asam amino) di *binding pocket* COX-2, dapat dilihat dalam Gambar 4.

Dari Gambar 3 dan Gambar 4 dapat dilakukan rancangan pengembangan senyawa 8 dengan memperhatikan ruang kosong di *binding pocket* COX-2 yang belum dimanfaatkan oleh senyawa 8. Penambahan residu aromatis non polar yang didesain sedemikian rupa sehingga dapat bersuperposisi dengan residu aromatis non polar yang ada pada senyawa S58 maupun ZINC03814717 (Gambar 3) diduga dapat memperbaiki skor ChemPLP secara signifikan sehingga mempunyai peluang untuk memiliki aktivitas sebagai inhibitor COX-2 dengan nilai IC_{50} yang lebih baik.



Gambar 4. Hasil penambatan molekul senyawa 8 di *binding pocket* COX-2. Senyawa 8 dilaporkan membentuk ikatan hydrogen (ditunjukkan sebagai garis hitam putus-putus) dengan residu asam amino ARG513 dan SER 530.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penapisan virtual sepuluh senyawa turunan metil sinamat ini diperoleh 3 senyawa turunan metil sinamat yang diprediksi aktif sebagai inhibitor COX-2 karena memiliki nilai ChemPLP lebih baik dari senyawa referensi ZINC03814717, dan senyawa asam 3-(4-benzoylphenyl) propionat memiliki nilai ChemPLP yang paling baik sehingga berpeluang sebagai inhibitor COX-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Muhammad Hanafi dan Dr. Enade Istyastono yang telah memberikan arahan, analisis dan saran terhadap tulisan ini. Penelitian ini didanai oleh Program Kompetitif LIPI.

DAFTAR PUSTAKA

1. A. Lelo ; Pertimbangan yang muncul dari OAINS yang digunakan. Dalam, Naskah Lengkap Temu Ilmiah Rematologi 2001. (eds. Setyohadi B, Kasjmir YI), Ikatan Reumatologi Indonesia, Jakarta, 96-99, **2001**.
2. D. L. Simmons, *Thromb Res.*, 110: 265 (**2003**) [PMID: 14592545]
3. WG.Bensen, JJ. Fiechther , JI.McMirren , et al. Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 74:1095-1105, **1999**.
4. EW.Ehrich. Effect of specific Cox-2 inhibition in osteoarthritis of the knee: a 6 week double blind placebo controlled pilot study of rofecoxib. *J Rheumatol* 26:2438-2447, **1999**.
5. GW.Cannon, JR.Caldwell, P.Holt, et al. Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium: results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip. Rofecoxib Phase III Protocol O35 Study Group. *Arthritis Rheum* 43:978-987, **2000**.
6. D. Motiejunas dan R.C. Wade, *Structural, Energetics, and Dynamic Aspects of Ligand-Receptor Interactions*. Di dalam: J.B. Taylor dan D.J. Triggle, Editor, *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 4: Computer-Assisted Drug Design*, Elsevier, **2006**.
7. N.Yuniarti; Z. Ikawati.; E.P. Istyastono. The importance of ARG513 as a hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitors in a virtual screening campaign. *Bioinformation* , 6, 164-6, **2011**.
8. N.M. O'Boyle; M. Banck.; C.James; C. Morley; T. Vandermeersch; G.R.Hutchison. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics* **2011**, 3, 33.
9. T. Ten Brink.; T.E. Exner.; Influence of protonation, tautomeric, and stereoisomeric states on protein-ligand docking results. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 1535-46.
10. Korb, O.; Stütze, T.; Exner, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 84-96.

11. T.D.Penning.; J.J. Talley.; S.R. Bertenshaw.; J.S. Carter.; P.W.Collins.; S. Docter.; M.J. Graneto.; L.F. Lee.; J. W. Malecha.; J.M. Miyashiro; R.S. Rogers; D.J. Rogier; S.S. Yu.; G.D.Anderson.; E.G. Burton.; J.N.Cogburn.; S. Gregory. a; C.M. Koboldt.; W.E. Perkins.; K. Seibert.; W. Veenhuizen.; Y.Y.Zhang.; P.C.Isakson. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene sulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1347-65.
12. R. Kurumbail; A. Stevens.; J. Gierse.; Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **1996**, *384*, 644-648.