

Studi Farmakofor Reseptor COX-2 Sebagai Anti Inflamasi

Nursalam Hamzah¹, Ahmad Najib², Nurshalati Thahir¹, Ika Misqawati¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

²Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia Makassar

ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX) receptor is a dual-function receptor that bound to the membrane which acts to catalyze two important stages in the formation of prostanoide, namely cyclooxygenation and peroxidation. Cyclooxygenation stage is the stage in which COX cyclization process and the addition of two molecules of oxygen to arachidonic acid to form prostaglandin G2 (PGG2). While the stage is the stage of the reduction of the peroxidation of PGG2 endoperoxide become unstable compound called prostaglandine H2 (PGH2). The purpose of this study is to determine the features that are important pharmacophore on anti-inflammatory activity of compounds on COX-2 receptor. Modeling and determination pharmacophore features created using the program MOE application version 2009 Virtual screening of chemical compounds to look for natural ingredients in accordance with pharmacophore features that have been made. Molecular docking to study ligand-receptor interactions, performed using MOE.

Keywords: *COX-2 receptor, inflammation, pharmacophore feature, virtual screening, docking molekuler.*

PENDAHULUAN

Inflamasi adalah proses kompleks yang terjadi melalui beberapa mekanisme yang menyebabkan perubahan di dalam aliran darah lokal dan pelepasan beberapa mediator inflamasi. Mediator-mediator inflamasi ini menyebabkan terjadinya vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskuler, dan migrasi leukosit menuju tempat terjadinya inflamasi (Martel- Pelletier dkk., 2003).

Inflamasi merupakan upaya untuk menghilangkan pemicu terjadinya luka (misalnya infeksi) dan untuk mengawali terjadinya proses penyembuhan luka. Meskipun demikian, inflamasi yang

bersifat progresif dapat menimbulkan penyakit-penyakit tertentu yang tidak diinginkan, seperti demam, periodonitis, atherosklerosis, rheumatoid arthritis, dan bahkan kanker. Hal-hal yang tidak diinginkan tersebut terjadi karena keluarnya enzim-enzim fagositosis dari sel-sel fagosit, seperti *phagocyte oxydase, inducible nitric oxyde synthase*, dan *lysosomal protease*, yang memproduksi senyawa-senyawa radikal bebas dan superoksida yang dapat menyebabkan luka pada jaringan sekitar (Abbas & Lichtman, 2004).

Terdapat lima tanda utama (*cardinal signs*) yang umumnya muncul

saat terjadinya inflamasi, yaitu nyeri (*dolor*), panas (*calor*), kemerahan (*rubor*), bengkak (*tumor*), dan hilangnya fungsi (*functio laesa*). Terjadinya panas dan kemerahan disebabkan oleh meningkatnya aliran darah, bengkak disebabkan oleh akumulasi cairan, nyeri disebabkan oleh pelepasan berbagai senyawa yang merangsang syaraf nyeri, dan hilangnya fungsi dipengaruhi oleh bermacam-macam sebab (Chandrasoma & Taylor, 2005).

Obat anti-inflamasi non-steroid (AINS) adalah obat yang digunakan untuk meredakan nyeri dan inflamasi. AINS terdiri dari kelompok AINS non-selektif yang bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase (COX-1 dan COX-2) sehingga menurunkan produksi prostaglandin, sedangkan kelompok AINS lain (selektif COX-2 inhibitor) bekerja dengan menghambat enzim COX-2. Produk obat kelompok AINS yang disetujui beredar di Indonesia antara lain adalah indometacin, etodolac, diklofenak, ibuprofen, naproxen, piroxicam, meloxicam, celecoxib, etoricoxib.

Aspirin dan obat anti-inflamasi nonsteroid (NSAID) adalah salah satu kelas obat-obatan yang paling banyak digunakan. NSAID diyakini bertindak melalui penghambatan sintesis prostaglandin (PG) dengan penghambatan enzim siklooksigenase (COX). Kebanyakan NSAID tidak hanya

menghambat PG pada lokasi inflamasi, tetapi PG juga berperan penting dalam bagian lain dari tubuh. Komplikasi yang paling sering dikaitkan dengan penggunaan NSAID adalah yang melibatkan saluran pencernaan (gastrointestinal). Perdarahan saluran pencernaan, ulserasi dan perforasi merupakan penyebab signifikan morbiditas dan mortalitas pada pasien yang dirawat dengan obat-obatan ini (NPS, 2010: 2).

Pemilihan obat saat ini diharapkan obat dengan selektivitas yang tinggi terhadap reseptor tertentu agar diperoleh efek terapi yang maksimal, oleh karena itu, penting untuk dilakukan suatu pengembangan obat. Salah satu metode pengembangan obat saat ini yang paling baik dan populer adalah berdasarkan pendekatan komputasi (*in silico*). Metode komputasi telah dikembangkan dan banyak digunakan untuk pengembangan hipotesis farmakologi dan pengujian.

Rancangan obat adalah usaha untuk mengembangkan obat yang telah ada, yang sudah diketahui struktur molekul dan aktivitas biologisnya, atas dasar penalaran yang sistematis dan rasional, dengan mengurangi faktor coba-coba seminimal mungkin.

METODE PENELITIAN

Konsep farmakofor pertama kali diperkenalkan pada tahun 1909 oleh

Ehrlich yang mendefinisikan farmakofor sebagai kerangka molekul yang membawa (phoros) fitur penting yang bertanggungjawab terhadap aktivitas biologis obat (Yang, 2010:1).

Farmakofor menurut *IUPAC* adalah faktor sterik dan elektronik yang diperlukan untuk memastikan terjadinya interaksi molekuler secara optimal dengan struktur target biologis spesifik sebagai penginduksi atau penghambat respon biologis (Mannhold dkk, 2006).

Alat dan data penelitian

Perangkat yang digunakan pada penelitian ini adalah perangkat keras berupa satu set *notebook* dengan spesifikasi: Processor tipe pentium Core™ i3-2348M CPU @ 2,30GHz, RAM 4,00 GB, dan harddisk 415 GB serta perangkat lunak sistem operasi Windows™ 7 Ultimate, dan MOE (*Molecular Operating Environment*).

Data dalam penelitian ini berupa struktur-struktur protein dan ligan yang diunduh dari situs RCSB PDB (*Protein Data Bank*)

Penentuan Sidik Jari Interaksi Ligan-Protein (*Protein-Ligand Interaction Fingerprint/PLIF*)

Sidik jari interaksi protein dengan ligan dibuat dengan menggunakan struktur-struktur protein yang diunduh dari situs RCSB PDB (*Protein Data Bank*). Seluruh struktur kemudian dibuka pada jendela MOE dan

disejajarkan (*superpose*) sehingga rantai memiliki struktur yang sama yang akan bergerak bersama-sama sebagai satu unit. Dengan cara ini kompleks protein-ligan dapat disejajarkan. File kemudian disimpan sebagai database. Dilakukan analisis *PLIF* dengan urutan perintah *DBV | Compute | PLIF | Generate* (Hamzah, 2013)

Penentuan Fitur Farmakofor

Penentuan fitur farmakofor diawali dengan mensejajarkan (*superpose*) seluruh protein yang diunduh dari situs RCSB. Tujuan dilakukannya pensejajaran tersebut adalah untuk mengetahui letak kesamaan struktur dari senyawa-senyawa ligan yang memiliki potensi sebagai inhibitor COX-2. Selanjutnya seluruh reseptor dan pelarut yang merupakan satu kesatuan dari makromolekul protein sebelumnya dihapus sehingga yang tampak pada jendela MOE hanya ligan- ligan yang telah disejajarkan.

Langkah selanjutnya adalah menjalankan *pharmacophore query editor* yang bertujuan untuk membuat fitur-fitur farmakofor dengan urutan perintah *MOE >> Compute >> Pharmacophore >> Query Editor*. Skema anotasi farmakofor otomatis membuat *query pharmacophore*, sehingga pada jendela MOE akan terlihat fitur-fitur farmakofor yang terdapat pada senyawa ligan. Skema anotasi yang digunakan

adalah *unified*. Titik anotasi yang sesuai dengan hasil penelitian interaksi ligan reseptor dipilih untuk menjadi fitur farmakofor. Langkah terakhir yaitu perbaikan *query* yang dimaksudkan untuk memodifikasi *query* atau menghasilkan kecocokan dengan pengaturan *query* yang lebih ketat.

Virtual Screening

Pada tahap virtual screening, yang digunakan adalah virtual skrining berbasis farmakofor dimana fitur farmakofor yang telah diperoleh pada tahap sebelumnya menjadi acuan dalam proses ini. Virtual skrining bertujuan untuk menemukan senyawa asal tanaman yang *hit* atau memiliki fitur kimia yang mirip dengan fitur farmakofor.

Senyawa asal tanaman yang digunakan diperoleh dari situs zinc database (www.zinc-docking.org) yang didownload dalam bentuk *.MOL2. Adapun jumlah senyawa yang didownload sebanyak 3509 senyawa. Selanjutnya dengan menggunakan program aplikasi MOE dibuat database senyawa yang telah didownload tersebut.

Setelah dibuat dalam bentuk database, selanjutnya masuk pada tahap pencarian senyawa asal tanaman yang *hit* dengan fitur farmakofor (urutan perintah *MOE >> Compute >> Pharmacophore >> Search*). Kemudian setelah proses pencarian selesai, jumlah senyawa yang *hit* tersebut akan

tampak pada panel *Pharmacophore Search*. Senyawa yang *hit* tersebut kemudian disimpan dalam database (*.mdb).

Docking Molekuler

Preparasi Ligan. Ligan dalam bentuk struktur tiga dimensi dan dioptimasi dengan metode *Ab initio* menggunakan program *HyperChem*. Struktur kemudian disimpan dalam format *.mol. File dibuka pada Jendela MOE. Struktur diprotonisasi untuk menambahkan hidrogen dan muatan parsial, dengan *Protonate 3D* (urutan perintah *MOE >> Compute >> Protonate 3D*) dengan setting pH 7.4 dan *cutoff* 10.0. File kemudian disimpan dalam database (*.mdb).

Preparasi Reseptor. Reseptor diunduh dari situs *RSCB.PDB* dengan kode 3TCP dalam format *.pdb/ent. Molekul air kemudian dihapus dari struktur. Protein kemudian diprotonisasi dengan langkah yang sama pada preparasi ligan. Asam amino arginin, lisin dan histidin yang memiliki gugus basa akan mengion pada pH 7.4 sehingga membentuk lingkungan kationik. Gugus- gugus asam seperti rantai samping karboksilat asam aspartat dan glutamat akan terdeprotonisasi menghasilkan gugus anion COO⁻ yang dapat berinteraksi dengan gugus ammonium. Untuk memastikan telah dilakukan protonasi, dilakukan pengecekan hingga

dipastikan tiap atom pada molekul memiliki muatan.

Simulasi Docking. Ligan dan reseptor yang telah diprotonisasi dibuka dalam Jendela MOE. Panel Simulasi *docking* dibuka dengan urutan perintah *MOE >> Compute >> Simulations >> Dock. Receptor* pada panel *Dock* diatur *Receptor+Solvent, Site* diatur *Ligand Atoms. Ligand* diatur *MDB File* (atau *Selected Atoms* jika Ligan terbuka pada Jendela MOE dan di-select). *Placement* diatur *Triangle Matcher, rescoring 1* menggunakan *London dG*, dan *refinement* diatur *Force Field*. Posisi *docking* terbaik dipilih berdasarkan nilai *rmsd* (≤ 2) dan nilai *scoring* terendah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Interaksi Protein-Ligan

Tujuan dari analisis interaksi protein-ligan ini adalah untuk mengetahui jenis-jenis dari asam amino yang terdapat pada situs aktif reseptor COX-2 yang kemudian akan berinteraksi dengan senyawa-senyawa ligan.

Struktur kompleks COX dengan ligan telah banyak diteliti. Terdapat 22 struktur protein COX yang telah dilaporkan dan dapat didownload dari situs RCSB PDB (www.rcsb.org), tetapi hanya 12 struktur kompleks COX-2 yang mengikat ligan yaitu dengan kode 4OTY, 4FM5, 4E1G, 3RR3, 3LN0, 3LN1,

3Q7D, 3NT1, 3OLU, 3MDL, 3HS6, dan 1PXX.

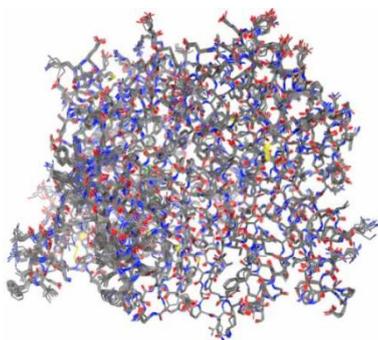
Dengan menggunakan 12 struktur kompleks ligan-protein tersebut di atas, dapat dibuat sidik jari interaksi ligan-protein dengan membandingkan cara pengikatan masing-masing ligan terhadap residu asam amino di sisi pengikatan protein. Metode ini berguna untuk meringkas interaksi antara ligan dan protein menggunakan skema sidik jari. Interaksi seperti ikatan hidrogen, interaksi ionik dan kontak permukaan yang diklasifikasikan sesuai dengan residu asal, dan dibangun dalam skema sidik jari yang merupakan representasi dari database dari protein-ligan kompleks.

Penyusunan Query Farmakofor Ligan

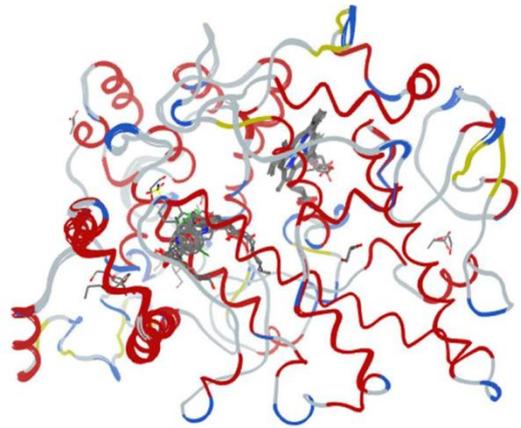
Tujuan dari penyusunan *query* farmakofor adalah untuk menjelaskan struktur 3D fitur senyawa-senyawa anti inflamasi untuk pengikatan dengan reseptor dengan menghasilkan farmakofor, dan untuk menentukan fitur struktur dari COX-2 yang penting untuk aktivitas biologis dengan melihat residu asam amino yang berperan pada pengikatan. Untuk penyusunan farmakofor digunakan *Pharmacophore Query Editor* dan *Protein-Ligand Interaction Fingerprint* pada program MOE. Farmakofor digunakan *Pharmacophore Query Editor* dan *Protein-Ligand Interaction Fingerprint* pada program MOE. Farmakofor

hipotetik yang dihasilkan juga akan menjelaskan pengikatan ligan dalam situs pengikatan atau katalitik dari reseptor.

Salah satu tahapan yang sangat penting dalam penyusunan *query* farmakofor ligan ini adalah pada proses pensejajaran struktur 12 protein yang telah diunduh dari situs RCSB. Seluruh protein tersebut harus benar-benar sejajar, karena akan sulit untuk membuat fitur farmakofor dari ligan ketika strukturnya tidak sejajar dengan baik. Adapun dalam proses pensejajaran tersebut, protein dibuka pada jendela MOE satu persatu dan disejajarkan setiap penambahan protein. Hal tersebut dilakukan agar pensejajaran struktur protein dapat berjalan maksimal dan menghasilkan struktur yang sejajar dengan baik. Selanjutnya untuk memastikan struktur protein telah sejajar dengan baik, maka pada bagian *ribbon* diubah *style* menjadi *line* sehingga akan tampak seperti benang-benang yang tersusun rapi.



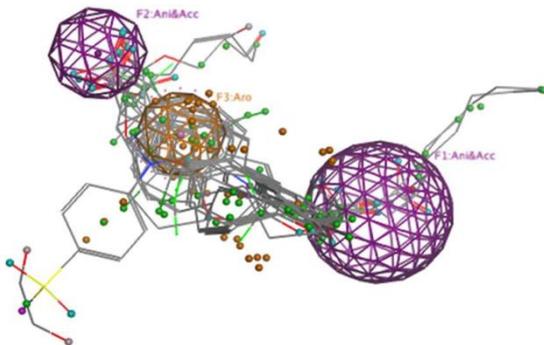
Gambar IV.2. Struktur protein yang telah disejajarkan (*superpose*)



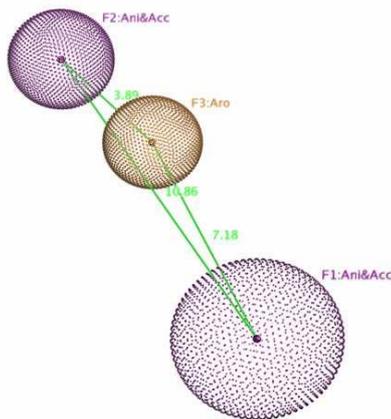
Gambar IV.3. Struktur protein sejajar dengan *style ribbon* dalam bentuk *line*

Sebelum masuk pada tahap membuat fitur farmakofor ligan, seluruh reseptor dan pelarut dihilangkan sehingga yang bertumpuk hanya struktur ligannya saja. Selanjutnya pembuatan fitur farmakofor ligan dapat dilakukan dengan menjalankan *Pharmacophore Query Editor*. Titik-titik anotasi ligan kemudian akan muncul secara otomatis. Adapun titik anotasi ligan yang dipilih terdapat tiga titik yang kemudian dibuat menjadi tiga fitur farmakofor. Ketiga fitur farmakofor tersebut masing-masing sebagai gugus anion dan akseptor proton (F1:Ani&Acc dan F2:Ani&Acc) dan gugus aromatik (F3:Aro). Tiga titik anotasi ligan tersebut dipilih karena banyaknya titik anotasi ligan yang bertumpuk pada titik tersebut. Di samping itu, berdasarkan interaksi ligan yang diperoleh pada tahap analisis interaksi ligan-protein, dapat dilihat interaksi ligan

dengan protein terjadi di titik anotasi ligan pada fitur F1:Ani&Acc dan F2:Ani&Acc.



Gambar IV.4. Fitur farmakofor ligan



Gambar IV.5. Jarak antar fitur-fitur dalam farmakofor *query*

Virtual Screening

Proses virtual skrining digunakan untuk membantu menemukan senyawa senyawa yang kemungkinan besar berpotensi sebagai obat, dengan membutuhkan waktu yang relatif singkat. Jika target telah diketahui, algoritma *docking* dapat digunakan untuk menempatkan kandidat obat ke dalam

sisi aktif dari target seperti enzim atau reseptor. Kemudian interaksi senyawa-senyawa yang telah diikat kemudian diurutkan berdasarkan hasil analisis secara komputasi komponen sterik dan elektrostatisnya.

Dewasa ini telah banyak ditemukan senyawa anti inflamasi dari bahan alam. Tetapi, belum diketahui senyawa-senyawa yang selektif menghambat COX-2. Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian yang secara khusus memodelkan interaksi beberapa senyawa yang diketahui memiliki aktivitas anti inflamasi melalui penghambatan COX-2.

Pada penelitian ini dilakukan proses virtual skrining terhadap 3509 senyawa kimia bahan alam yang diunduh dari situs zinc database. Dari proses tersebut diperoleh 13 senyawa kimia bahan alam yang *hits* dengan fitur farmakofor ligan yang memiliki interaksi dengan reseptor COX-2.

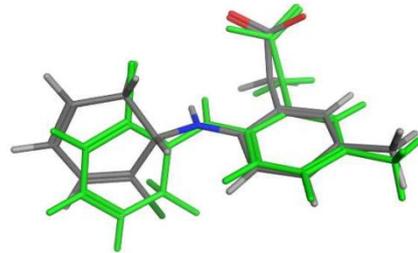
Docking Molekuler

Sebelum dilakukan *docking*, molekul target harus dipreparasi terlebih dahulu. Molekul yang telah didownload dari situs RCSB PDB ditampilkan pada jendela MOE. Agar tidak mengganggu proses *docking* nantinya, molekul-molekul air sebaiknya dihilangkan sehingga dipastikan yang berinteraksi adalah molekul uji dan

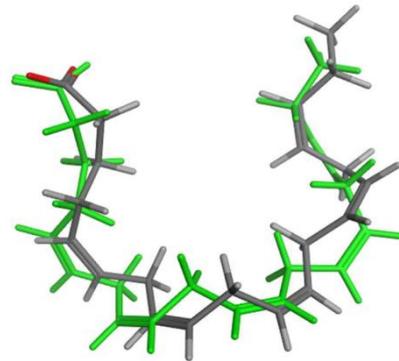
molekul target. Selanjutnya dilakukan protonasi untuk menambahkan muatan atom dan hidrogen pada molekul. Struktur protein yang digunakan adalah struktur 4OTY. Tahap selanjutnya adalah tahap *docking* senyawa-senyawa uji terhadap COX-2. Pada proses *docking* senyawa uji ini digunakan perangkat lunak MOE versi 2009.

Proses simulasi *docking* senyawa-senyawa uji diawali dengan mengidentifikasi kantung atau sisi pengikatan dari enzim tersebut. Selanjutnya dengan fasilitas *simulation dock*, senyawa-senyawa uji sebagai ligan di-*docking*-kan pada reseptor, serta diarahkan pada sisi pengikatan yang sebelumnya telah diidentifikasi. Proses *docking* menggunakan ligan fleksibel dan reseptor *rigid* menggunakan metode *scoring London dG*. Validasi metode *docking* dilakukan dengan *redocking* native ligan pada binding site. Didapatkan nilai *rmsd (root mean square deviation)* lebih kecil dari 2 yang berarti metode tersebut memiliki validitas yang tinggi, artinya posisi ligan *copy* mirip dengan posisi ligan asli. Tabel IV.1 menunjukkan bahwa senyawa asal tanaman yang diperoleh dari situs ZINC Database dapat mengikat Arg 120, Tyr 355, Tyr 385, Ser 530, Arg 513. Interaksi yang terjadi antara senyawa-senyawa asal tanaman dengan reseptor ditunjukkan dengan nilai *docking score*

(S), makin rendah nilai S maka interaksi antara keduanya makin kuat.



Gambar IV.7. Posisi Ligan Asli Protein 4OTY



Gambar IV.9. Posisi Ligan Asli Protein 3HS6

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Asam amino yang penting dalam interaksi reseptor COX-2 dengan beberapa senyawa anti inflamasi yaitu Arg 120, Ser 530, Tyr 355, dan Tyr 385. Adapun *query* farmakofor yang berperan dalam interaksi ligan-reseptor memiliki fitur dua gugus

anion dan akseptor proton, dan gugus aromatik.

2. Senyawa-senyawa yang memiliki potensi sebagai inhibitor COX-2 berdasarkan hasil dari *virtual screening* terdapat 13 senyawa.

KEPUSTAKAAN

Hamzah, Nursalam. *Studi Hubungan Kuantitatif Strukturaktivitas, Fitur Farmakofor Dan Docking Molekuler Senyawa Turunan Pirazolo-[3,4-D]-Pirimidin Sebagai Inhibitor Mer Tirosin Kinase*. Institut Teknologi Bandung, Bandung. 2013.

Mannhold, R., H. Kubinyi, G. Folkers, 2006, *Pharmacophore and Pharmacophore Searches*, Wiley – VCH, Weinheim, 3

National Prescribing Service (NPS).
2010. COX-2-Selective NSAIDs
: New Wonder Drugs?

Yang, S.-Y., 2010, Pharmacophore Modelling and Applications in Drug Discovery: Challenges and Recent Advances, *Drug Discovery Today*, **15**, 444-450.