



Jurnal Pharmacia Mandala Waluya Vol.3 No.3
ISSN : 2829-6850
<https://jurnal-pharmacnmw.com/jpmw/index.php/jpmw>
DOI : <https://doi.org/10.54883/jpmw.v3i3.102>



Skrining Virtual Berbasis Farmakofor Dari Database Bahan Alam Sebagai Inhibitor Alosterik Mutan T790M/C797 EGFR Untuk Penemuan Obat Kanker Paru

Nur Ayu Lestari¹, Muhammad Isrul¹, Dwi Syah Fitra Ramadhan¹, Fatahu²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Mandala Waluya

²Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Halu Oleo

ABSTRAK

Kanker paru adalah tumor ganas primer yang berasal dari saluran nafas atau epitel bronkus. Terjadinya kanker ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak normal, tidak terbatas, dan merusak sel-sel jaringan yang normal. Salah satu reseptor yang memiliki peran penting untuk menghambat pertumbuhan kanker paru yaitu EGFR. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas senyawa bahan alam sebagai inhibitor alosterik mutan T790M/C797 EGFR untuk obat kanker paru. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang dilakukan secara komputasi, metode pemodelan farmakofor berbasis struktur menggunakan *software LigandScout*, skrining virtual menggunakan pharmit dan penambatan molekul menggunakan *software Autodock tools* dengan parameter penambatan dilihat berdasarkan nilai *root mean squad deviation* (RMSD) terendah. Kode reseptor EGFR yaitu 5D41, sedangkan ligan pembanding adalah 57N. Hasil penelitian didapatkan validasi model farmakofor yaitu nilai $AUC_{100\%}=0,61$ yang terdiri dari 2 fitur Hidrofobik, 1 fitur H Bond Donor. Penapisan berbasis farmakofor terhadap database *Coconut* menghasilkan 270.001 senyawa hit. Hasil penambatan molekul menunjukkan bahwa senyawa CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide) memiliki nilai binding energi (ΔG) yang baik yaitu -11,65 dan konstanta inhibisi (K_i) 2,91 nM, dapat disimpulkan bahwa senyawa CNP0179931 memiliki nilai afinitas pengikatan yang lebih baik bila dibandingkan dengan ligan alami, sedangkan analisis interaksi dilihat berdasarkan kesamaan ikatan hidrogen, *van der waals*, dan ikatan hidrofobik.

Kata kunci: Kanker Paru, EGFR, Skrining Virtual, Penambatan Molekul

Pharmacophore-Based Virtual Screening From Natural Compound Database as C790M/C797 EGFR Mutant Allosteric Inhibitor For Lung Cancer Drug Discovery

ABSTRACT

Lung cancer is a primary malignant tumor originating from the respiratory tract or bronchial epithelium. The occurrence of cancer is characterized by abnormal cell growth, is not limited, and damages normal tissue cells. One of the receptors that have an important role to inhibit the growth of lung cancer is EGFR. The purpose of this study was to determine the activity of natural compounds as allosteric inhibitors of the T790M / C797 EGFR mutant for lung cancer drugs. This study was a descriptive study carried out computationally, structure-based pharmacophore modeling method using Ligand Scout software, virtual screening using pharmit, and molecular docking using Auto dock tools software with the docking parameter seen based on the lowest root mean squad deviation (RMSD) value. The EGFR receptor code was 5D41, while the comparison ligand was 57N. The results of the study obtained validation of the pharmacophore model, namely the AUC value of 100 % = 0.61 which consisted of 2 hydrophobic features, and 1 H Bond Donor feature. Pharmacophore-based screening of the Coconut database resulted in 270,001 hit compounds. The molecular docking results showed that the compound CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizine-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide) had a good binding energy value (ΔG), namely -11.65 and the inhibition constant (K_i) 2.91 nM. Therefore, it can be concluded that the compound CNP0179931 had a better binding affinity value when compared to natural ligands, while the interaction analysis was seen based on the similarity of hydrogen bonds, van der Waals, and hydrophobic bonds.

Keywords: Lung cancer; EGFR; Virtual screening; Molecular docking. (bahasa Inggris, minimal 3 keywords)

Penulis Korespondensi :

Nur Ayu Lestari

Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Mandala Waluya

E-mail : nurayulestari1i017@gmail.com

Info Artikel :

Submitted : 31 Juli 2023

Revised : 16 Agustus 2023

Accepted : 2 Maret 2024

Published : 25 Juni 2024

PENDAHULUAN

Kanker paru adalah tumor ganas primer yang berasal dari saluran nafas atau epitel bronkus. Terjadinya kanker ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak normal, tidak terbatas, dan merusak sel-sel jaringan yang normal. Secara global, kanker masih merupakan salah satu masalah besar dalam kesehatan masyarakat dalam hal morbiditas, mortalitas, dan biaya. Pada tahun 2019, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan bahwa kanker adalah penyebab kematian utama atau kedua pada orang-orang yang berusia di bawah 70 tahun di 112 dari 183 negara (World Health Organization, 2021).

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) merupakan sub kelompok reseptor tirosin kinase yang sering diekspresikan pada beberapa jenis kanker (Harari, 2004). Penghambatan aktivitas EGFR merupakan salah satu strategi rasional dalam terapi antikanker (Seshacharyulu *et al*, 2012). Inhibitor tirosin kinase EGFR generasi pertama yang telah disetujui oleh FDA adalah gefitinib dan erlotinib. Obat ini merupakan kelompok *small molecule tyrosine kinase inhibitor* (TKI) yang bekerja sebagai antagonis ATP di daerah intraseluler (Yewale *et al.*, 2013).

Dalam penggunaannya, inhibitor-inhibitor ini memiliki keterbatasan terkait dengan masalah resistensi atau berkurangnya respon tumor. Oleh karena itu upaya mengembangkan inhibitor baru dengan peningkatan efikasi merupakan hal yang sangat penting untuk mengatasi masalah tersebut (Huang & Fu, 2015).

Dalam upaya penemuan dan pengembangan obat baru, senyawa bahan alam dengan keragaman kimia dan aktivitas

biologinya dapat menjadi sumber obat yang baik dan telah menjadi fokus banyak penelitian karena dinilai jauh lebih aman ditinjau dari tingkat toksisitasnya. Beberapa senyawa bahan alam yang dapat menghambat EGFR diantaranya yaitu isoflavanoid, Saponis, Glikosida Flavonon, Polifenol, Terpenoid, Alkaloid, Kuinon, Resin, dan Neuklosida (Li *et al.*, 2018).

Berdasarkan sejarah, penemuan obat baru diperoleh melalui sistem *screening* secara farmakologi menggunakan hewan coba, namun dengan banyaknya senyawa yang bisa mencapai ratusan bahkan ribuan, sangat tidak efisien apabila senyawa-senyawa tersebut diujikan satu per satu melalui *screening* secara farmakologi.

Selain itu, dilihat dari segi biaya tentunya akan membutuhkan biaya yang cukup besar serta waktu yang cukup lama. Oleh karena itu dengan adanya teknologi informasi, dikembangkanlah metode *screening* untuk mencari calon obat dengan menggunakan komputer. Dengan adanya teknologi informasi ini proses *screening* dilakukan dengan metode *in silico* (simulasi komputer). Akan adanya kebutuhan inhibitor tirosin kinase EGFR yang lebih poten dengan tingkat keamanan yang lebih baik, maka dalam penelitian ini akan dilakukan skrining terhadap suatu database senyawa bahan alam untuk mengidentifikasi inhibitor tirosin kinase EGFR dengan pendekatan Computer-Aided Drug Design (CADD).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara komputasi dan merupakan tahapan awal dalam proses penemuan dan pengembangan inhibitor tirosin kinase EGFR baru dari bahan alam.

Diharapkan dari penelitian ini dapat diperoleh senyawa-senyawa hit, yang pada tahap selanjutnya dapat digunakan sebagai senyawa penuntun untuk mendesain inhibitor-inhibitor baru dengan aktivitas dan tingkat keamanan yang lebih baik.

METODE

Alat

a. Perangkat Keras

Perangkat Keras Laptop Asus X441U dengan spesifikasi Windows 11 Home, Intel® Core i3-6006U CPU @ 2.00GHz (4 CPUs), ~2.0GHz, RAM 8GB DDR4, SSD 120GB.

b. Perangkat Lunak

Perangkat lunak yang digunakan yaitu *BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019*, *Auto Dock Tools* versi 1.5.6, *LigandScout Advance* versi 4,3, *DecoyFinder 2.0*, dan *BindingDB*

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah struktur 3D protein dari Reseptor EGFR yang diperoleh dari Bank Data Protein dengan situs <http://www.rcsb.org/pdb/>. Identitas makromolekul tersebut 5D41 yang berformat .pdb, struktur 3D Ligan yang digunakan adalah senyawa bahan alam yang didapatkan dari situs Coconut database <https://coconut.naturalproducts.net/>.

Persiapan Reseptor

Reseptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah reseptor Alosterik Mutan T790M/C797 EGFR. Identitas makromolekul tersebut 5D41 yang berformat .pdb. diunduh dari situs protein data bank (PDB) melalui website <https://www.rcsb.org/pdb>.

Preparasi *active set* dan *decoy set*

Dilakukan pembuatan database sebagai *active set* dan *decoy set* dengan menggunakan aplikasi ligandScout. Database yang diperoleh akan digunakan untuk validasi model farmakofor yang akan dibuat.

Preparasi Struktur Makromolekuler

Preparasi struktur molekul EGFR dan ligan asli yang didapatkan dari Protein Data Bank melalui website (www.rcsb.org) dengan kode PDB 5D41 yang akan digunakan dalam tahap selanjutnya yaitu pada tahap penyaringan database berdasarkan model farmakofor. Kemudian dilakukan penghapusan molekul air dan preparasi pada ligan alami dan protein. Selanjutnya dilakukan preparasi meliputi penambahan atom hidrogen.

Pemodelan dan Validasi Skrining Farmakofor

Senyawa aktif yang diambil dari *BindingDB*, dengan rentang aktivitas diatur ke IC_{50} : 0,1000M nM. Decoy atau umpan yang diunduh melalui situs <http://dude.docking.org> dalam format .sdf kemudian dikonversi dan disimpan dalam format .ldb. Model farmakofor dibangun dari struktur 57N yang merupakan ligan alami dengan menggunakan perangkat lunak *LigandScout Advance* versi 4.3. Model farmakofor yang baik akan mampu mengidentifikasi sebagian besar senyawa *active* yang dikenal, dan sesedikit mungkin *decoy*. Analisis yang digunakan untuk mengevaluasi hasil validasi yaitu nilai $AUC_{100\%}$, parameter ini digunakan valid apabila nilai $AUC_{100\%} \geq 0,50$.

Penyaringan Database Berdasarkan Model Farmakofor

Digunakan database coconut yang diakses melalui website *Pharmit* (www.pharmit.csb.pitt.edu/) yang disaring menggunakan model farmakofor terbaik untuk mendapatkan senyawa hit. Senyawa hit yang didapatkan akan digunakan pada proses *molecular docking*.

Penambatan Molekul

Selanjutnya dilakukan validasi metode docking dengan menggunakan software *Auto Dock Tools* versi 1.5.6 parameter yang didapatkan apabila metodenya valid yaitu nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) metode *docking* dinyatakan valid apabila nilai RMSD, apabila $RMSD \leq 2\text{\AA}$, apabila nilai $RMSD \geq 2\text{\AA}$ maka metode tidak valid (Ruswanto *et al.*, 2020). Setelah dilakukan validasi, dilakukan simulasi *docking* antara EGFR dengan senyawa hit yang didapatkan dari hasil penyaringan database berdasarkan model farmakofor

menggunakan software *Auto Dock Tools* versi 1.5.6. Kemudian skor docking dilakukan peringkat dan dibandingkan dengan ligan asli menggunakan software *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* 2019.

Pengelolaan dan Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan mengurutkan nilai ligan dengan energi ikatan terendah ke ligan yang mempunyai energi ikatan yang lebih tinggi dan *pharmacophore-fit*. Analisis hasil docking menggunakan software *Discovery studio* untuk melihat interaksi senyawa bahan alam terhadap Reseptor EGFR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

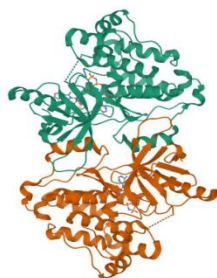
Hasil

Hasil informasi reseptor yang diperoleh dari situs PDB (*Protein Data Bank*)

Analisis informasi reseptor yang diperoleh melalui situs PDB (<https://www.rcsb.org/>) dengan kode PDB 5d41 yang digunakan untuk protein.

Tabel 1. Informasi Reseptor

Nama	<i>EGFR kinase domain in complex with mutant selective allosteric inhibitor</i>
Kode PDB	5D41
Organisme	Homo Sapiens
Metode	X-RAY DIFFRACTION
Resolusi	2.31 Å



Gambar 1. Reseptor EGFR



Gambar 2. Visualisasi 3D hasil RMSD


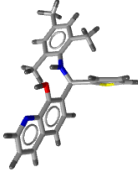
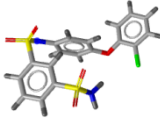
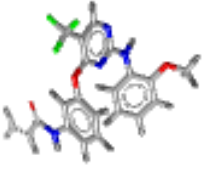
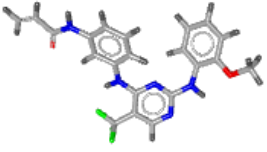
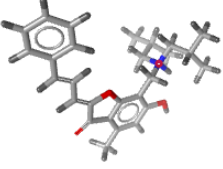
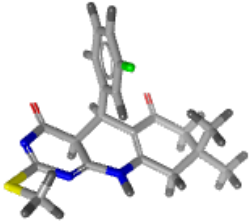
Pemodelan Farmakofor


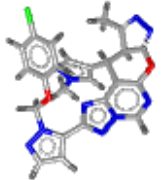
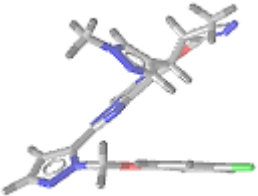
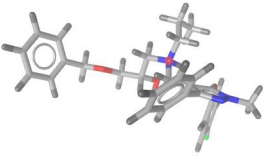
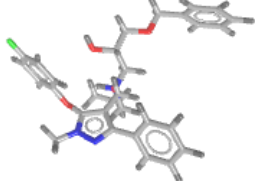
Penentuan *Activ set* dan *Decoy set*

Sebanyak 613 *aktiv set* yang diperoleh dari *BindingDB*, dengan rentang aktivitas diatur ke IC_{50} : 0,1000M nM. Dan sebanyak 35398 *Decoy set* atau umpan yang diunduh melalui situs <http://dude.docking.org> dalam format .sdf

1. Pemodelan dan validasi Farmakofor

Tabel 2. Fitur Model Farmakofor dan Nilai AUC-ROC

Model	Fitur Farmakofor	Aktif set terdeteksi	Decoy set terdeteksi	AUC-ROC
	2H, 1HBA	527/613	28017/35398	0,58
	2H, 1HBA, 1HBD	112/613	6070/35398	0,50
	1H, 1HBA, 1HBD	297/613	14084/35398	0,52
	2H, 1HBA, 1HBD	181/613	6939/35398	0,55
	2H, 1HBA, 1HBD	172/613	7540/35398	0,53
	3H, 1HBD	139/613	9146/35398	0,48
	1H, 1HBA	190/613	8830/35398	0,54

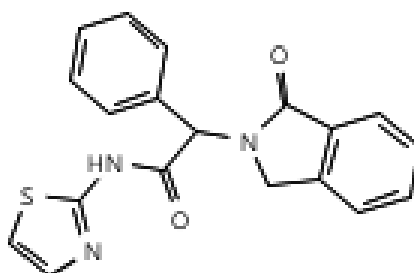
	3H, 1HBA	401/613	24758/35398	0,42
	2H, 1HBA	439/613	24573/35398	0,57
	2H, 1HBD	88/613	108/35398	0,45
	2H, 1HBD	494/613	26876/35398	0,61
	2H, 1HBA	398/613	23175/35398	0,45

Keterangan :

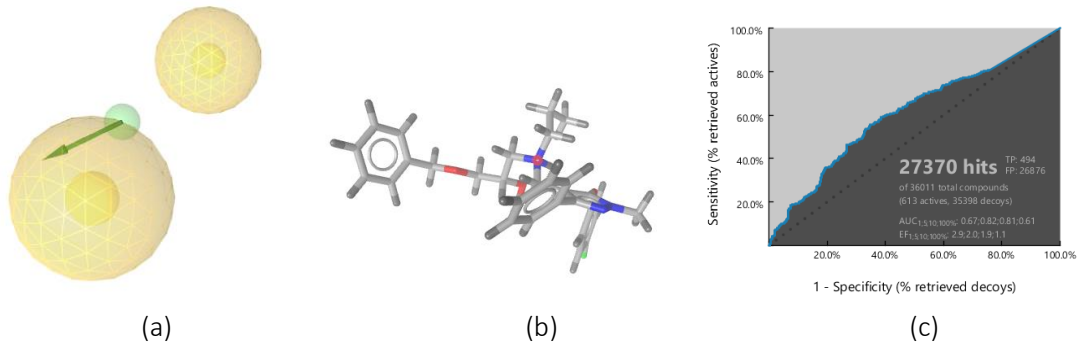
H = Hidrofobik

HBA = H Bond Akseptor

BHD = H Bond Donor



Gambar 3. Struktur 2D 57N (Ligan Alami)



Gambar 4. (a) Fitur Model Farmakofor, (b) Struktur 3D, (c) Kurva AUC tervalidasi

Keterangan :

Kuning = Hidrofobik

Hijau = H Bond Donor

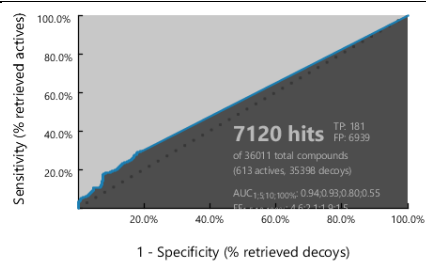
Model farmakofor dinyatakan valid apabila memiliki nilai AUC-ROC yang lebih besar dari 0,50 (Arba *et al.*, 2019). Parameter nilai grafik AUC-ROC digunakan untuk menggambarkan model farmakofor yang

akurat (Piciullo *et al.*, 2017). Dengan demikian dipilih model farmakofor ke-11 dimana model ke-11 ini memiliki nilai AUC-ROC sebesar 0,61 yang terdiri dari 3 fitur yaitu 2 fitur Hidropobik, 1 Fitur H-Bond Donor.

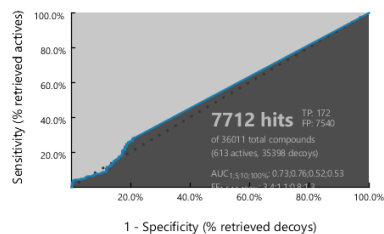
Tabel 3. Grafik AUC-ROC Pemodelan Farmakofor

Model	Grafik
Pemodelan 1	
Pemodelan 2	
Pemodelan 3	

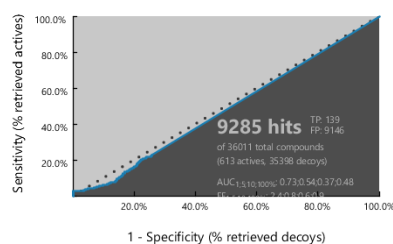
Pemodelan 4



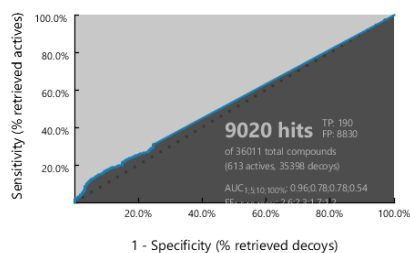
Pemodelan 5



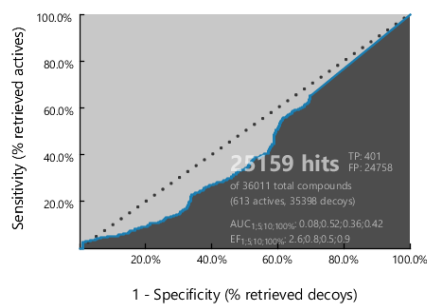
Pemodelan 6



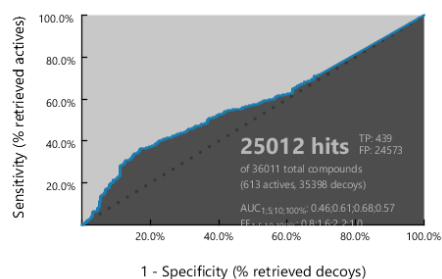
Pemodelan 7



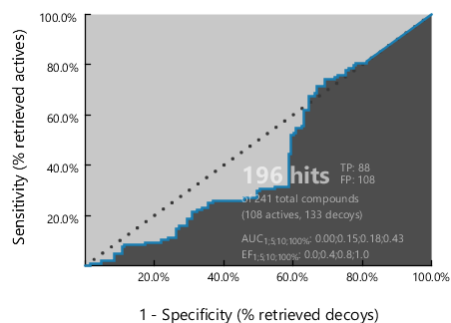
Pemodelan 8



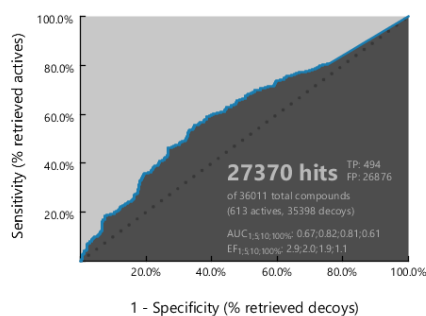
Pemodelan 9



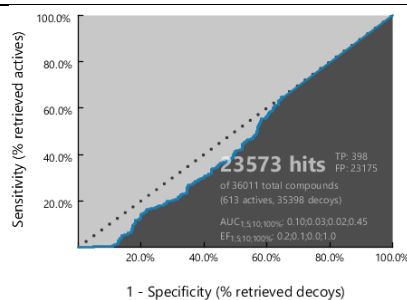
Pemodelan 10



Pemodelan 11



Pemodelan 12

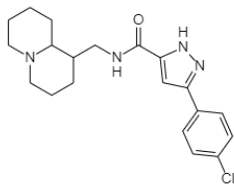


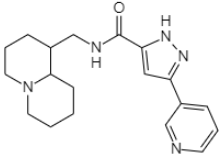
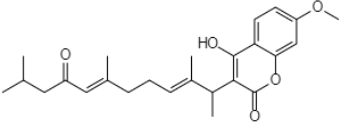
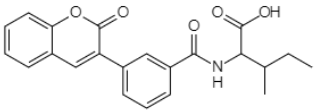
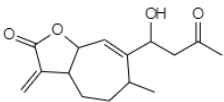
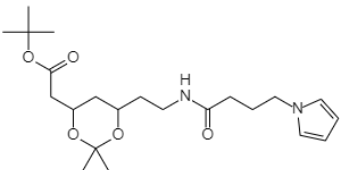
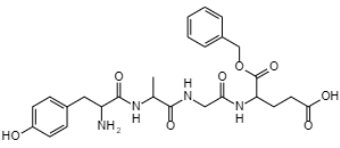
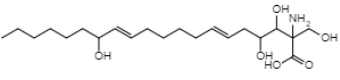
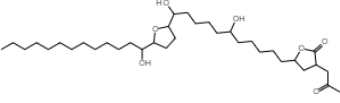
2. Hasil Skrining Virtual Senyawa Bahan Alam

Hasil skrining virtual dari database Coconut yang terdiri dari 404.574 senyawa yang telah tersedia pada *website* Pharmit (www.pharmit.csb.pitt.edu/). Proses penyaringan database Coconut menghasilkan 270.001 hits lalu diambil 10

senyawa hit dengan nilai RMSD terendah yang kemudian akan di simpan dan akan digunakan dalam penambatan molekul terhadap reseptor EGFR.

Tabel 4. Hasil Skrining Virtual Senyawa Bahan Alam

ID	Nama	RMSD	Gambar
CNP0179931	3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide	0,007	

CNP0402572	N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-3-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide	0,012	
CNP0223069	Pallidone A	0,016	
CNP0388008	3-methyl-2-[[3-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)phenyl]formamido]pentanoic acid	0,023	
CNP0196577	Parthemollin	0,025	
CNP0321371	tert-butyl 2-(2,2-dimethyl-6-{2-[4-(1H-pyrrol-1-yl)butanamido]ethyl}-1,3-dioxan-4-yl)acetate	0,026	
CNP0341836	4-(2-{2-[2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanamido]propanamido}acetamido)-5-(benzyloxy)-5-oxopentanoic acid	0,026	
CNP0293313	Mycestericin A	0,027	
CNP0303987	Isoannonacin	0,029	

CNPO421478	1,4-dihydroxy-3-({3-[23-hydroxy-6,17-dimethyl-20-(2-methylpropyl)heptacyclo[14.5.1.1 ⁴ ,21.1 ⁸ ,11,0 ¹ ,13.0 ⁵ ,11.0 ¹³ ,1 ⁸]	0,032	
	tetracos-2,9,14,19-tetraen-22-yl]propanoyl}oxy)-6-[(2-hydroxypropyl)amino]-9-oxabicyclo[3.3.1]non-7-en-2-yl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[[7-(2-hydroxyethyl)-2-(hydroxymethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl]methyl]prop-2-enoate		

3. Penambatan Molekul

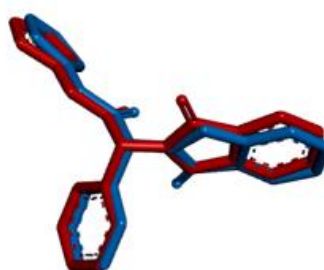
1. Validasi Metode

Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan cara *redocking* antara ligan alami dan reseptor yang telah dihilangkan ligan bawaannya yang diunduh dari situs bank data protein menggunakan perangkat lunak *AutoDock Tools*[®].

Tabel 5. Pengaturan *Grid Box*

Ukuran Grid Box			Ukuran Grid Center			Spacing (Amstrong)	RMSD
X	Y	Z	X	Y	Z		
40	40	40	-23.037	31.46	12.091	0,376	1,58 Å

Hasil Validasi Docking



Gambar 5. Tumpang Tindih Ligan (Merah) Sebelum Validasi (Biru) Setelah Validasi

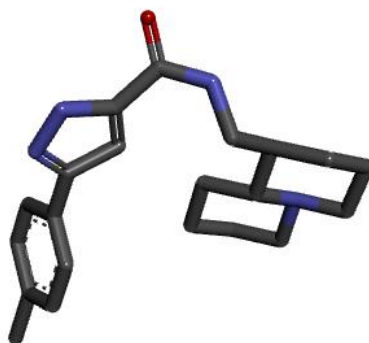
Hasil validasi metode docking terhadap reseptor menunjukkan nilai RMSD 1,58Å. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode *docking* yang digunakan telah valid

dan pengaturan parameter yang digunakan telah memenuhi kriteria validasi. Selanjutnya dilakukan penambatan molekul terhadap database *coconut nature product*.

2. Hasil Penambatan Molekul Senyawa Bahan Alam

Tabel 6. Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (KI)

ID	Senyawa	ΔG (Kkal/mol)	KI
	Ligan Alami 57N	-11,48	3,97 nM
CNP0179931	3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide	-11,65	2,91 nM
CNP0402572	N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-3-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide	-10,51	19,74 nM
CNP0223069	Pallidone A	-10,47	21,17 nM
CNP0388008	3-methyl-2-[[3-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)phenyl]formamido]pentanoic acid	-9,86	58,75 nM
CNP0196577	Parthemollin	-9,77	68,67 nM
CNP0321371	tert-butyl 2-(2,2-dimethyl-6-{2-[4-(1H-pyrrol-1-yl)butanamido]ethyl}-1,3-dioxan-4-yl)acetate	-8,94	282,06 nM
CNP0341836	4-(2-{2-[2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanamido]propanamido}acetamido)-5-(benzyloxy)-5-oxopentanoic acid	-8,62	2,01 μ M
CNP0293313	Mycestericin A	-7,51	3,15 μ M
CNP0303987	Isoannonacin	-0,83	246,88 nM
CNP0421478	1,4-dihydroxy-3-({3-[23-hydroxy-6,17-dimethyl-20-(2-methylpropyl)heptacyclo[14.5.1.1 ⁴ .2 ¹ .1 ⁸ .11.0 ¹ .13.0 ⁵ .11.0 ¹³ .18]	23,19	-
	tetracos-2,9,14,19-tetraen-22-yl]propanoyl)oxy)-6-[(2-hydroxypropyl)amino]-9-oxabicyclo[3.3.1]non-7-en-2-yl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[[7-(2-hydroxyethyl)-2-(hydroxymethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl]methyl]prop-2-enoate		



Gambar 6. Struktur Senyawa Hit Terbaik CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide)

Hasil penambatan molekul menunjukkan bahwa beberapa senyawa bahan alam memiliki aktivitas yang baik terhadap reseptor EGFR. Senyawa bahan alam yaitu 3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide adalah yang paling baik yang mampu berinteraksi dengan protein EGFR memiliki nilai energi bebas

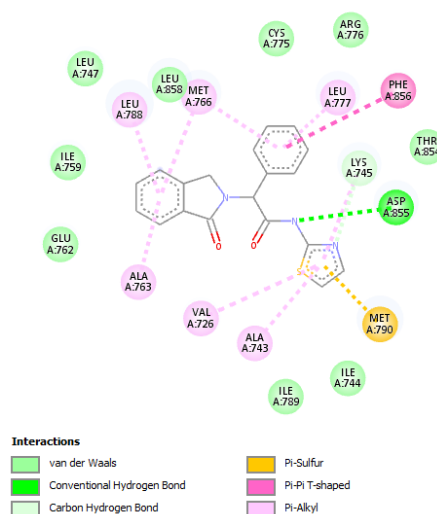
Gibbs (ΔG) = -11,65 kkal/mol dan untuk ligan alami memiliki nilai energi bebas Gibbs (ΔG) = -11,46 kkal/mol sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa bahan alam yaitu 3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide lebih stabil jika dibandingkan dengan ligan alami

Tabel 7. Hasil Interaksi Asam Amino

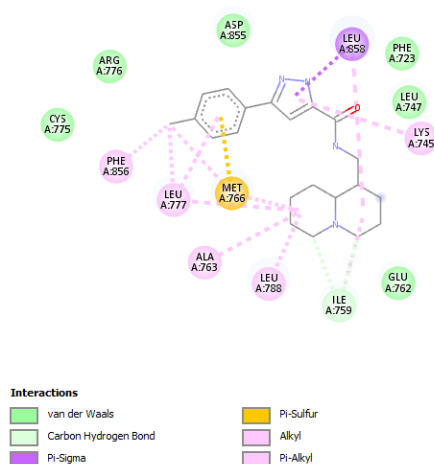
Senyawa	Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrofobik	Ikatan Van Der Waals
Ligan alami 57N	LYS745, ASP855,	MET790,PHE856, ALA763,LEU788, LEU777,MET765, VAL726,ALA743	ARG776,CYS775, LEU747,LEU858, THR854,ILE759, GLU762,ILE789, ILE744
CNP0179931	ILE759	LEU858,MET766, PHE856,LYS745, LEU777,LEU858, LEU788	CYS775,ARG776, LEU747,PHE723, ASP855,GLU762

Keterangan :

LYS = Lisin	LEU = Leusin
ASP = Aspartat	VAL = Valin
ILE = Isoleusin	ARG = Arginin
MET = Metionin	CYS = Sistein
PHE = Phenylalanine	THR = Threonin
ALA = Alanin	GLU = Glutamin



Gambar 7. Interaksi Ligan Alami (57N) dengan Reseptor EGFR



Gambar 8. Interaksi CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide) dengan Reseptor EGFR.

PEMBAHASAN

Skринing virtual merupakan salah satu metode yang terdapat dalam desain obat berbentuk komputer yang berperan penting dalam penemuan senyawa hit baru (Kumalo & Soliman, 2015). Adapun tujuannya untuk merangking atau menyaring senyawa kimia baik dari sintesis, database dan lain sebagainya menggunakan salah satu atau lebih metode komputasi. Salah satu metode komputasi yang digunakan dalam virtual skринing adalah penambatan molekuler. Desain obat berbentuk komputer terdiri atas desain obat berbasis struktur dan berbasis ligan (Arba *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini dilakukan skринing virtual berbasis farmakofor untuk mengembangkan pemodelan farmakofor yang dapat digunakan untuk menyaring senyawa hit baru yang kemudian dilakukan penambatan molekul untuk mengetahui ikatan antara senyawa hit dengan reseptor Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan

kandidat senyawa baru yang diprediksi aktivitas sebagai inhibitor EGFR yang berasal dari senyawa bahan alam.

Langkah pertama pada skринing virtual ini yaitu pemodelan dan validasi farmakofor. Pemodelan farmakofor bertujuan untuk memperoleh model farmakofor terbaik yang kemudian model tersebut akan digunakan untuk menyaring senyawa-senyawa bahan alam yang memiliki gugus farmakofor penting dalam aktivitas farmakologi sebagai inhibitor EGFR. Kemudian model farmakofor yang didapatkan di validasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa model tersebut telah valid. Model farmakofor dinyatakan valid apabila nilai UAC-ROC dari pemodelan farmakofor adalah lebih besar dari 0,50 (Arba *et al.*, 2019).

Dalam penelitian ini dilakukan pencarian data dengan menggunakan berbagai sumber database, database yang diperoleh terdiri dari *BindingDatabase*, *Database Coconut*. Tahap yang paling pertama dilakukan dalam penelitian ini yaitu melakukan pencarian *active set compound*, *active set*

diperoleh dengan mengakses database yang sudah tersedia pada website Binding Database.

Setelah didapatkan *active set*, selanjutnya dilakukan pencarian *decoy set*. *Decoy set* dapat diperoleh dengan melalui beberapa program salah satunya dengan menggunakan DUD-E. *Decoy set* adalah dataset yang terdiri dari senyawa-senyawa yang tidak aktif dan tidak memiliki aktivitas farmakologi atau diartikan sebagai senyawa yang tidak aktif secara farmakologi. Langkah selanjutnya yaitu pemodelan farmakofor dari *active set* dan *decoy set* yang telah ada.

Fitur model farmakofor yang dibangun dari kode reseptor 5D41 terdiri dari 5 fitur yaitu 3 fitur hidrofobik, 1 fitur H-Bond Akseptor dan 1 fitur H-Bond Donor. Model farmakofor tersebut dikembangkan dengan menggunakan kombinasi dari 5 fitur tersebut dan divalidasi terhadap 613 *active set* atau senyawa aktif yang diperoleh dari *website BindingDB* dan 35398 *decoy sets* atau senyawa pengecoh yang diperoleh dari *website* <http://dude.docking.org/targets>. Kemudian model farmakofor yang diperoleh dilakukan validasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa model tersebut sudah valid, tujuan dilakukan validasi yaitu dapat membedakan antara senyawa aktif dan senyawa tidak aktif.

Berdasarkan hasil pada Tabel 4 dipilih model farmakofor ke-11 dari 12 model yang dikombinasi dimana model ke-11 terdiri dari 2 Fitur Hidrofobik dan 1 Fitur H-Bond Donor dan memiliki nilai AUC sebesar 0,61. Nilai AUC-ROC yang mendekati 1 menunjukkan bahwa model farmakofor semakin baik dan mampu membedakan antara *test set* atau senyawa aktif dengan *decoy set* atau senyawa pengecoh (Arba *et al.*, 2019). Sehingga hasil validasi dalam penelitian ini dinyatakan valid. Alasan penggunaan validasi menggunakan nilai AUC-

ROC karena nilai AUC (area under curva) sudah memiliki persentasi senyawa aktif dalam daftar senyawa hit, memiliki spesifitas atau kemampuan model yang dibangun untuk identifikasi senyawa tidak aktif, dan memiliki sensitivitas atau kemampuan model yang dibangun untuk identifikasi senyawa aktif. Grafik nilai AUC-ROC yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5.

Penyaringan database model farmakofor digunakan database Coconut yang berisi 404.547 senyawa yang telah tersedia pada *website* *Pharmit* (www.pharmit.csb.pitt.edu/). Proses penyaringan database Coconut berdasarkan model terbaik menghasilkan 270.001 hits yang kemudian dipilih 10 senyawa teratas dan nilai RMSD terendah yang akan di simpan dan akan digunakan dalam penambatan molekul terhadap reseptor EGFR. Senyawa hit adalah istilah penemuan yang merujuk pada identifikasi senyawa kimia yang dipastikan memiliki aktivitas pengikatan pada target.

Selanjutnya yaitu penambatan molekul. Penambatan molekul merupakan simulasi secara komputasi yang digunakan untuk memprediksi ikatan antara obat/ligan dan reseptor/protein dengan memasang suatu molekul kecil (ligan) pada sisi aktif dari reseptor, yang sampai saat ini banyak digunakan dalam proses penemuan dan pengembangan obat baru dengan aktivitas yang lebih baik. Kelebihan metode penambatan molekul (*molecular docking*) adalah dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa sebelum dilakukan sintesis sehingga mengurangi penggunaan pelarut dan bahan-bahan kimia yang dapat mencemari lingkungan. Salah satu aplikasi yang banyak digunakan untuk simulasi penambatan molekul ini adalah Autodock, karena aplikasi ini mudah diperoleh dan

mudah untuk digunakan sehingga untuk mengetahui aktivitas senyawa bahan alam sebagai inhibitor EGFR maka dapat dilakukan dengan menggunakan metode penambatan molekul dengan menggunakan program aplikasi Autodock Tools® (Arba *et al.*, 2019).

Langkah awal dalam proses penambatan molekul yaitu preparasi reseptor dan preparasi ligan. Reseptor diperoleh dengan menggunakan kode PDB 5D41 dengan Resolusi struktur kristal (5D41) adalah 2,31 Å sesuai dengan rentang resolusi yang baik yaitu 1,5-2,7Å, karena pada rentang tersebut protein akan stabil dalam melakukan penambatan molekul (Tsika *et al.*, 2022).

Disimpan dalam file reseptor.pdb. Setelah itu dilakukan preparasi untuk menghilangkan residu-residu yang terdapat dalam reseptor, dengan cara menghilangkan molekul air. Penghilangan molekul air bertujuan untuk mengurangi beban komputasi yang akan membuat waktu simulasi menjadi relatif lama. Oleh karena itu, dengan adanya molekul air akan membuat simulasi tidak praktis untuk digunakan. Setelah penghilangan molekul air selanjutnya ditambahkan atom hidrogen dan muatan. Penambahan dilakukan karena biasanya protein yang terdapat dari hasil sinar-X tidak memiliki atom hidrogen selain itu penambahan atom hidrogen bertujuan untuk menyesuaikan suasana docking agar mendekati suasana pH dalam tubuh. Setelah dipreparasi reseptor disimpan dalam file reseptor.pdbqt (Arba *et al.*, 2019).

Setelah proses preparasi reseptor selesai selanjutnya yaitu preparasi ligan alami dan ligan uji. Ligan alami diperoleh dari reseptor 5D41 yang kemudian dilakukan redocking ulang dengan tujuan sebagai pembandingan antara senyawa uji, sedangkan ligan senyawa uji diperoleh dari *Coconut database* yang disimpan dalam file

liganuji.pdb. setelah itu ligan dipreparasi dan disimpan dalam file liganuji.pdbqt. Menggunakan Autodock Tools®.

Selanjutnya validasi metode penambatan molekul dengan cara *redocking* antara ligan alami (57N) yang dihasilkan dari reseptor EGFR yang telah dihilangkan ligan bawaannya menggunakan perangkat lunak Autodock Tools®. Grid Box diatur dengan menyesuaikan ukuran koordinat dari grid center (X = 40Å, Y = 40 Å, Z = 40 Å) dan grid size (X = -23.037, Y = 31.467, Z = 12.091).

Hasil validasi metode docking terhadap reseptor EGFR pada menunjukkan nilai RMSD 1.58 Å. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode docking yang digunakan telah valid dan pengaturan parameter yang digunakan telah memenuhi kriteria validasi. Parameter docking dikatakan valid jika desain dapat menambatkan ligan alami atau kompleks ligan ke posisi semula dengan parameter nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) kurang dari 2Å juga bergantung pada besar dan kecilnya ukuran ligan (Hevener *et al.*, 2009)

Selanjutnya, dilakukan simulasi docking terhadap senyawa uji. Senyawa uji di dapatkan dari hasil skrining virtual dari database coconut. Diambil 10 senyawa terbaik dari hasil skrining virtual, senyawa diambil berdasarkan urutan teratas dan nilai RMSD yang terendah. Kemudian senyawa di unduh pada website *Coconut Natural Product* dengan format 3D Sdf. Simulasi docking dilakukan dengan ukuran grid dan koordinat yang sama pada proses validasi metode docking pada reseptor EGFR dengan Ligan alami 57N ((2R)-2-(1-oxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-2-phenyl-N-(1,3-thiazol-2-yl)acetamide).

Dalam penelitian ini menggunakan 1 ligan alami yang diperoleh dari hasil preparasi reseptor yang dipisahkan dengan ligan dan 10 senyawa uji terbaik. Senyawa uji yang

diperoleh dari hasil skrining virtual dengan ID senyawa CNP0179931, CNP0196577, CNP0223069, CNP0293313, CNP0303987, CNP0321371, CNP0341836, CNP0388008, CNP0402572, CNP0421475.

Hasil simulasi docking menunjukkan bahwa 1 senyawa bahan alam yang memiliki energi ikatan yang terendah yaitu CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide) dengan energi ikatan sebesar -11,65 kkal/mol dengan nilai konstanta inhibisi 2,91 nM dan membentuk 14 ikatan. Sedangkan nilai energi ikatan ligan alami (57N) yaitu -11,48 kkal/mol dan nilai konstanta inhibisi 3,97 nM. Sehingga nilai ligan uji memiliki energi ikatan dan konstanta inhibisi lebih rendah dibandingkan dengan ligan alami.

Berdasarkan hasil pada Tabel 8 senyawa CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide) memiliki energi ikatan yang terendah yaitu -11,65 kkal/mol dan memiliki nilai konstanta inhibisi 2,91 nM. Energi ikatan tersebut menunjukkan kestabilan pengikatan ligan terhadap reseptor. Semakin kecil (semakin negatif) energi ikatan semakin stabil (kuat) ikatan yang dihasilkan (kompleks protein-ligan) sehingga waktu kontak ligan dan reseptor akan lebih lama. Sedangkan konstanta inhibisi merupakan nilai yang dapat menunjukkan hambatan antara ligan dan protein target. Semakin kecil nilai konstanta inhibisi menunjukkan semakin kecil hambatan yang terjadi dalam ikatan ligan-reseptor. Kompleks ligan-reseptor dikatakan memiliki afinitas ikatan yang baik jika memiliki nilai K_i pada skala nanomolar. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazole-5-

carboxamide) merupakan senyawa yang memiliki afinitas terbaik karena memiliki nilai energi ikatan terendah dan konstanta inhibisi skala nanomolar.

Setelah proses *docking* selesai dan didapatkan 1 senyawa yang memiliki afinitas terbaik terhadap reseptor EGFR maka selanjutnya senyawa tersebut dilakukan visualisasi dengan menggunakan DiscoveryStudio 2017 untuk melihat interaksi yang terbentuk. Dalam interaksi ligan-reseptor, interaksi yang biasa terjadi adalah interaksi elektrostatik, ikatan hidrogen, ikatan van der Waals dan interaksi hidrofobik (Arwansyah & Hasrianti, 2014).

Hasil analisis interaksi asam amino yang sudah dilakukan, menunjukkan bahwa ligan 57N memiliki 19 ikatan yang terdiri dari 2 ikatan hidrogen, 9 ikatan van der Waals, 8 ikatan hidrofobik. Kemudian untuk senyawa CNP0179931 memiliki 14 ikatan yang terdiri dari 1 ikatan hidrogen, 7 ikatan van der Waals, dan 7 ikatan hidrofobik.

Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang melibatkan interaksi atom hidrogen yang terikat secara kovalen dengan atom elektronegatif seperti fluor (F), nitrogen (N) dan oksigen (O). Ikatan hidrogen memiliki nilai energi bebas ikatan -1 sampai -7 kkal/mol tetapi biasanya ada pada rentang -3 sampai -7 kkal/mol. Ikatan hidrogen bertanggung jawab dalam spesifitas ligan-reseptor. Semakin banyak ikatan hidrogen yang dihasilkan, maka semakin kuat afinitas suatu ligan terhadap reseptor (Muttaqin, 2019). Hasil analisis *docking* memperlihatkan, pada ligan 57N (ligan pembanding) diperoleh 1 ikatan hidrogen konvensional dengan residu asam amino pada kompleks EGFR yaitu Asp855, dan 1 ikatan hidrogen karbon dengan residu asam amino pada kompleks EGFR yaitu Lys745. Senyawa CNP0179931 (3-(4-chlorophenyl)-N-

[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-1H-pyrazocarboxamide) merupakan senyawa dengan energi ikatan terendah membentuk 1 ikatan hidrogen karbon dengan residu asam amino pada kompleks EGFR yaitu Ile759.

Ikatan van der Waals merupakan kekuatan tarik menarik antar molekul atau atom yang tidak bermuatan. Ikatan van der Waals terlibat pada interaksi cincin benzen dengan daerah bidang datar reseptor dan pada interaksi rantai hidrokarbon dengan reseptor. Ikatan van der Waals memiliki energi bebas ikatan yaitu -0,5 kkal/mol. Meski ikatannya lemah namun hasil dari penjumlahan ikatan van der Waals merupakan faktor pengikat yang cukup bermakna (Siswandono dan Soekardjo, 2011).

Dari hasil analisis diperoleh, Pada ligan alami 57N membentuk 9 ikatan van der Waals dengan residu asam amino pada reseptor EGFR yaitu Leu747, Leu858, Cys775, Arg776, Ile759, Glu762, Ile789, Ile744, Thr854. Senyawa CNP0179931 membentuk 7 ikatan van der Waals dengan residu asam amino pada reseptor EGFR yaitu Cys775, 776, Asp855, Phe723, Leu747, Glu762.

Interaksi hidrofobik merupakan interaksi yang terjadi bila dua gugus nonpolar seperti gugus non polar ligan dan gugus nonpolar reseptor saling mendekat dan bergabung, sehingga molekul air menjadi kacau dan tidak dapat bergabung dengan molekul air lainnya. Hal ini dapat meningkatkan entropi yang berakibat menurunnya energi ikatan sehingga dapat menstabilkan kompleks ligan-reseptor. Interaksi hidrofobik memiliki peran dalam menentukan kekuatan interaksi. Interaksi hidrofobik meliputi ikatan pi-pi, pi-alkil, pi-sigma, pi-sulfur, pi-anion dan pi-kation

(Parthasarathy Seshacharyulu, Moorthy P Ponnusamy, Dhanya Haridas, Maneesh Jain & Batra, 2023). Dari hasil analisis diperoleh, ligan alami 57N membentuk 8 interaksi hidrofobik dengan residu asam amino pada reseptor EGFR yaitu ikatan pi-sulfur dengan Met790, ikatan pi-pi T-shaped Phe856, dan ikatan pi-Alkyl Leu788, Met766, Leu777, Ala763, Val726, Ala743. Sedangkan senyawa CNP0179931 membentuk 7 interaksi hidrofobik dengan jenis ikatan pi-sigma dengan residu asam amino Leu858, ikatan pi-sulfur dengan residu asam amino Met766, ikatan pi-alkyl dengan Phe856, Leu777, Ala763, Leu788, ikatan Alkyl dengan residu asam amino Lys745.

Berdasarkan hasil perbandingan 2 senyawa tersebut maka ditarik kesimpulan bahwa senyawa Ligan alami memiliki ikatan yang paling banyak. Namun dengan demikian penentuan afinitas yang utama yaitu berdasarkan nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan juga nilai konstanta inhibisi terendah dibandingkan dengan jumlah interaksi yang terbentuk (Fakih *et al.*, 2022) dan untuk kemiripan interaksi asam amino antara ligan alami dengan CNP0179931 memiliki banyak kemiripan interaksi asam amino.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap 10 senyawa uji ditemukan 1 senyawa aktif yang paling baik yaitu CNP0179931, yang memiliki afinitas yang lebih kuat bila dibandingkan dengan ligan alami (57N). Energi ikatan menggambarkan afinitas atau kemampuan suatu senyawa untuk dapat berikatan dengan target protein. Nilai energi ikatan yang semakin rendah menunjukkan afinitas yang semakin kuat. Maka berdasarkan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi senyawa uji CNP0179931 memiliki potensi sebagai inhibitor EGFR.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa Hasil identifikasi senyawa bahan alam yang fit dengan farmakofor EGFR berdasarkan uji skrining virtual sebagai Inhibitor Alosterik Mutan T790/C797 EGFR yaitu terdapat 270.001 senyawa. Hasil prediksi aktivitas hit senyawa bahan alam dari model farmakofor berdasarkan penambatan molekul pada database *Coconut Natural Product* yang berisi 404.547 senyawa. Dari 10 senyawa uji yang dilakukan penambatan molekul ditemukan 1 senyawa uji yang memiliki potensi terbaik yaitu senyawa CNP0179931 dengan energi ikatan yang terendah yaitu -11.65 kcal/mol dengan konstanta inhibisi (Ki) sebesar 2,91 nM yang memiliki aktivitas lebih kuat bila dibandingkan dengan ligan alami (57N). Sehingga di prediksi berpotensi menghambat Inhibitor Alosterik Mutan T790/C797 EGFR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Mandala Waluya dan kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arba, M., Azali, H., Ombe, S., Armid, A., & Usman, I. (2019). 3D-QSAR, molecular docking and dynamics simulation of difluorophenol pyridine derivatives as RSK2 inhibitor. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(6), 1–9.
- Arwansyah, & Hasrianti. (2014). Simulasi Molecular Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) Pada Kanker Prostat. *Jurnal Dinamika*, 5(2), 60–75.
- Fakih, T. M., Jannati, F. A., Meilani, A., Ramadhan, D. S. F., & Darusman, F. (2022). Studi In Silico Aktivitas Analog Senyawa Zizyphine dari Bidara Arab (*Zizyphus spina-christi*) sebagai Antivirus SARS-CoV-2 terhadap Reseptor 3CLpro. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 18(1), 70.
- Harari, P. M. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer*, 11(4), 689–708.
- Huang, L., & Fu, L. (2015). Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 390–401.
- Kirk E. Hevener., Zhao Wei., David M. Ball., Babaoglu Kerim., Jianjun Qi., Stephen W. White., R. E. L. (2007). Dihydropteroate synthase. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–7.
- Muttaqin, F. Z. (2019). Molecular Docking and Molecular Dynamic Studies of Stilbene Derivative Compounds As Sirtuin-3 (Sirt3) Histone Deacetylase Inhibitor on Melanoma Skin Cancer and Their Toxicities Prediction. *Journal of Pharmacopolium*, 2(2), 112–121.
- Parthasarathy Seshacharyulu, Moorthy P Ponnusamy, Dhanya Haridas, Maneesh Jain, A. K. G., & Batra, S. (2023). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy: What's new in 2023? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 27(4–5), 305–324.
- Rachmania, R. A. (2019). Validasi Protokol Skrining Virtual Dan Analisis Interaksi Inhibitor Antiproliferasi Sel Kanker Berbasis Bahan Alam Terhadap Reseptor Cyclin-Dependent Kinase 4 (Cdk 4). *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 16(1), 21.
- Ruswanto, R., Mardianingrum, R., Siswandono, S., & Kesuma, D. (2020). Reverse docking, molecular docking, absorption, distribution, and toxicity prediction of artemisinin as an anti-diabetic candidate. *Molekul*, 15(2), 88–96.
- Tsika, A. C., Gallo, A., Fourkiotis, N. K., Argyriou, A. I., Sreeramulu, S., Löhr, F., Rogov, V. V., Richter, C., Linhard, V., Gande, S. L., Altincekic, N., Krishnathas, R., Elamri, I., Schwalbe, H., Wollenhaupt, J., Weiss, M. S., & Spyroulias, G. A. (2022). Binding Adaptation of GS-441524 Diversifies Macro Domains and

Downregulates SARS-CoV-2 de-MARylation Capacity. *Journal of Molecular Biology*, 434(16).

Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., & Misra,

A. (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials*, 34(34), 8690–8707.

Jurnal Pharmacia Mandala Waluya (JPMW) is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

