

STUDI HUBUNGAN KUANTITATIF STRUKTUR-AKTIVITAS SENYAWA TURUNAN MEISOINDIGO SEBAGAI INHIBITOR CDK4

Muhammad Arba^{*}, Riki Ardiansyah, Messi Leonita

Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari, Sulawesi Tenggara, Indonesia, 93231
email :arba_muh@yahoo.com

Received 12 July 2016

Accepted 30 November 2016

Abstrak

Cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) adalah target penting dalam penanganan kanker dan pencarian senyawa yang dapat menghambat aktivitas CDK4 sedang giat dilakukan di seluruh dunia. Pada penelitian ini dilakukan analisis Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas (HKSA) senyawa turunan meisoindigo sebagai inhibitor CDK4 untuk memperoleh persamaan HKSA yang dapat digunakan untuk desain inhibitor baru berbasis meisoindigo yang lebih poten dan selektif terhadap CDK4. Data senyawa dibagi menjadi *training set* untuk membangun model HKSA dan *test set* untuk validasi model. Perhitungan deskriptor dilakukan menggunakan MOE2009.10 dan analisis regresi multilinear dilakukan menggunakan SPSS19.0. Hasil penelitian menyatakan bahwa aktivitas penghambatan CDK4 dari senyawa turunan meisoindigo bergantung pada beberapa momen dipol, energi total, energi elektronik, panas pembentukan, dan kelarutan. Akurasi model HKSA yang diusulkan divalidasi dengan teknik validasi silang dan dengan validasi eksternal. Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk desain senyawa inhibitor CDK4 yang lebih baik dari turunan meisoindigo.

Kata kunci: HKSA, meisoindigo, kanker, CDK4

Abstract

Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) is an important target in the treatment of cancer. Exploring of compounds that can inhibit the activity of CDK4 is actively performed worldwide. This research was conducted to do Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) analysis of meisoindigo derivative compounds as inhibitor for CDK4 in order to get QSAR equation, then it was further used to design new inhibitor based meisoindigo which has more potent and selective for CDK4. Data compound is divided into training set to build QSAR models and the test set to validate the model. Calculation was done by MOE2009.10 descriptor and multilinear regression analysis, SPSS19.0. The results showed that the inhibitory activity of meisoindigo derived compounds toward CDK4 was depended on several dipole moment, total energy, electronic energy, heat of formation, and solubility. The accuracy of QSAR models proposed validated by cross validation techniques and with external validation. The results of this study can be used to design a new CDK4 inhibitor compound better than meisoindigo derivative

Keywords: QSAR, meisoindigo, cancer, CDK4

Pendahuluan

Kanker telah menjadi salah satu penyebab kematian terbesar di seluruh dunia. Sel kanker dicirikan oleh pertumbuhan yang tidak terkendali dan pembelahan terus-menerus yang lebih cepat dibandingkan dengan sel normal. Sel kanker terus tumbuh dan bersifat invasif sehingga sel normal tubuh dapat terdesak atau bahkan mati. Organisasi Kesehatan Dunia, *World Health Organization* (WHO) (2012) menyatakan bahwa di seluruh dunia terdapat 14,1 juta kasus kanker baru, 8,2 juta kematian akibat kanker dan 32,6 juta orang hidup dengan mengidap penyakit kanker. Salah satu penyakit kanker yang banyak terjadi yaitu kanker payudara. Kanker payudara menempati urutan ke lima penyebab kematian akibat kanker secara keseluruhan. Di Indonesia kanker payudara merupakan kanker nomor 1 yang sering terjadi pada wanita dengan angka kejadian 30,5% dan angka kematian 21,5% dibandingkan dengan penyakit kanker lainnya (Depkes, 2009)

Terdapat tiga metode penanganan kanker yaitu pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Pengobatan dengan menggunakan obat-obat antikanker (kemoterapi) dapat dijadikan suatu alternatif dalam penyembuhan penyakit kanker. Kekurangan kemoterapi yaitu selektivitas yang rendah, yaitu berhubungan dengan ketidakmampuan agen kemoterapi membedakan sel normal dan sel kanker, sehingga penggunaannya dalam jangka panjang dibatasi karena memiliki efek samping yang berbahaya. Hal ini menuntut perlunya dilakukan usaha terus-menerus untuk mendapatkan agen anti kanker dengan aktivitas yang lebih tinggi dan toksisitas yang lebih rendah.

Pada tahun 2015, Chiou dkk. menunjukkan bahwa salah satu senyawa yang berpotensi sebagai antikanker adalah senyawa turunan meisoindigo. Meisoindigo adalah turunan dari senyawa indirubin yang sebelumnya telah diketahui aktivitasnya sebagai antikanker dengan mekanisme kerja menghambat *cyclin dependent kinase* (CDK) pada pembelahan sel. Meisoindigo memiliki

sifat yang kurang toksik dan aktivitas lebih baik pada sel kanker.

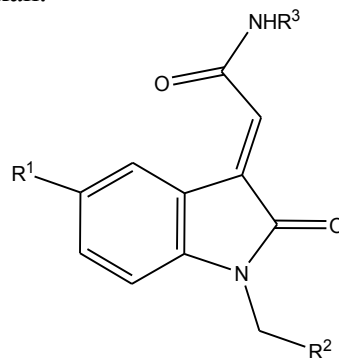
Chiou dkk. (2015) telah meneliti beberapa senyawa turunan meisoindigo dan menguji secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara dan diperoleh fakta bahwa turunan meisoindigo memiliki aktifitas yang baik terhadap sel kanker payudara. Diketahui senyawa turunan meisoindigo berikatan dengan cyclin dependent kinase 4 (CDK4) yang merupakan enzim yang berperan dalam siklus sel sehingga mencegah pembelahan sel.

Pada penelitian ini dilakukan analisis Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas (HKSA) senyawa turunan meisoindigo untuk memperoleh persamaan HKSA. Suatu persamaan HKSA menggambarkan hubungan matematis antara karakteristik fisiko-kimia dengan aktivitas biologis pada suatu seri turunan senyawa tertentu. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan untuk desain senyawa turunan meisoindigo baru yang memiliki aktivitas penghambatan CDK4 yang lebih baik.

METODE PENELITIAN

Data set

Sebanyak 20 senyawa turunan meisoindigo yang disintesis oleh Chiou dkk (2015) yang memiliki aktivitas penghambatan pada CDK4 digunakan dalam penelitian ini. Gambar 1 dan Tabel 1 menunjukkan struktur senyawa yang digunakan.



Gambar 1. Senyawa meisoindigo

Tabel 1. Turunan meisoindigo yang digunakan dalam penelitian (Chiou dkk (2015))

Senyawa	R1	R2	R3	IC ₅₀ MCF-7 (μM)
1	H	<i>p</i> -Cl-Ph	<i>p</i> -pyridinil	14
2	H	<i>p</i> -Cl-Ph	6-quinolinyl	3,5
3	H	3-methylisoxazolyl	<i>p</i> -MeO-Ph	4
4	H	3-methylisoxazolyl	<i>p</i> -pyridinil	3,6
5	H	3-methylisoxazolyl	6-quinolinyl	3,2
6	MeO	3-methylisoxazolyl	6-quinolinyl	2,3
7	H	2-naphthalenyl	6-quinolinyl	4,7
8	H	<i>p</i> -CF ₃ -Ph	6-quinolinyl	1,5
9	H	<i>p</i> -Br-Ph	6-quinolinyl	2,5
10	H	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	6-quinolinyl	2,4
11	Me	<i>p</i> -Cl-Ph	6-quinolinyl	6,2
12	H	2,6-Cl ₂ -Ph	6-quinolinyl	4,1
13	H	3-methylisoxazolyl	3-methylisoxazolyl	3,9
14	H	3-methylisoxazolyl	<i>m</i> -pyridinil	13,4
15	MeO	<i>p</i> -NH ₂ -Ph	6-quinolinyl	27,9
16	MeO	<i>p</i> -Br-Ph	6-quinolinyl	3,1
17	OH	<i>p</i> -Br-Ph	6-quinolinyl	3,5
18	H	H	Phenyl	84,9
19	H	H	6-quinolinyl	44,7
20	H	Me	6-quinolinyl	64,3

Pengembangan model HKSA

Untuk pengembangan model HKSA, 20 senyawa tersebut dibagi menjadi *training set* sebanyak 16 senyawa dan *test set* sebanyak 4 senyawa. Training set digunakan untuk membangun model HKSA, sedangkan *test set* digunakan untuk validasi model yang telah dibangun. Senyawa dibangun menggunakan GaussView dan dioptimasi menggunakan metode semi empirik Austin Model 1 (AM1). Perhitungan deskriptor dilakukan menggunakan perangkat lunak MOE (Molecular Operating Environment - MOE 2009). Model HKSA dibangun menggunakan teknik regresi multi linear untuk mendapatkan variabel yang paling penting dan paling berpengaruh pada aktivitas senyawa. Validasi model HKSA dilakukan menggunakan teknik validasi silang *leave one out* (LOO) yang diindikasikan dengan diperolehnya nilai koefisien validasi silang (q^2). Menurut Tropsha (2010), suatu model HKSA dianggap baik jika memiliki nilai $q^2 > 0,5$. Nilai q^2 diperoleh dengan menggunakan rumus berikut:

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{pred} - y)^2}{\sum (y - \bar{y})^2} \quad (1)$$

dimana y_{pred} adalah aktivitas prediksi, y adalah aktivitas eksperimen, dan \bar{y} adalah aktivitas rata-rata (Hawkins dkk. 2003).

Hasil dan Pembahasan

Pemilihan Data Set

Data set yang digunakan dalam penelitian ini merupakan 20 senyawa turunan meisoindigo yang telah diuji secara *in vitro*. Data set ini kemudian dibagi menjadi dua kelompok data yakni data *training set* dan data *test set*. Data *training set* berfungsi untuk membuat persamaan HKSA dan data *test set* digunakan untuk memvalidasi persamaan HKSA yang telah terpilih. Data *training set* terdiri dari 16 senyawa dan data *test set* terdiri dari 4 senyawa. Data *training set* dan *test set* dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Data senyawa *training set* dan *test set*.

Kode Senyawa	Log IC ₅₀ Eksperimen (μM)
S8	0,18

S6	0,36
S10	0,38
S9	0,4
S16	0,49
S5*	0,51
S2	0,54
S17	0,54
S4	0,56
S13	0,59
S3	0,6
S12	0,61
S7	0,67
S11*	0,79
S14	1,13
S1*	1,15
S15	1,45
S19*	1,65
S20	1,81
S18	1,93

Senyawa dengan tanda * adalah senyawa yang digunakan sebagai *test set*

Perhitungan Nilai Deskriptor

Pada setiap senyawa data set yang telah dioptimasi kemudian dilakukan perhitungan nilai deskriptor dengan menggunakan aplikasi MOE. Deskriptor yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 13 deskriptor yang mewakili 3 parameter utama yaitu parameter hidrofobik, elektronik dan sterik. Deskriptor yang digunakan meliputi lipofilisitas (LogP), kelarutan (LogS), luas permukaan hidrofobik (ASA_H), polaritas atom total (Apol), orbital molekul tertinggi yang terisi elektron, *highest*

occupied molecular orbital (AM1_HOMO), orbital molekul terendah yang tidak terisi elektron, *lowest unoccupied molecular orbital* (AM1_LUMO), energi total (AM1_E), energi elektronik (AM1_Eele), momen dipol (AM1_dipole), panas pembentukan (AM1_HF), globularitas (glob), volume van der Waals (Vol), dan refraktivitas molar (Mr). Setelah dilakukan perhitungan nilai deskriptor, dihitung nilai XZSCORE dari tiap senyawa. Nilai XZSCORE digunakan dalam menentukan senyawa yang berpeluang besar dikeluarkan jika penyebaran data yang didapat tidak merata.

Analisis Statistik Persamaan HKSA

Hasil perhitungan nilai deskriptor tiap senyawa yang telah didapatkan dari hasil perhitungan menggunakan aplikasi MOE digunakan untuk membangun persamaan HKSA. dengan melakukan analisis regresi multilinear. Analisis regresi multilinear ini menggunakan variabel bebas berupa nilai 13 deskriptor dan variabel terikat berupa nilai IC₅₀ eksperimen dari masing-masing senyawa *training set*. Hasil perhitungan analisis statistik regresi multilinear ditampilkan pada **Tabel 3**. Berdasarkan analisis tersebut, didapatkan 10 model persamaan HKSA, setelah itu dipilih persamaan yang paling baik.

Tabel 3. Deskriptor dan nilai koefisien korelasi serta *standard error of estimate* (SEE) untuk setiap model HKSA

No.	Deskriptor	R	R ²	Standard error of estimate (SEE)
1	(Konstan), vol, AM1_LUMO, AM1_HF, AM1_dipole, glob, logS, AM1_HOMO, logP(o/w), AM1_E, ASA_H, apol, AM1_Eele	0,978	0,957	0,243
2	(Konstan), vol, AM1_HF, AM1_dipole, glob, logS, AM1_HOMO, logP(o/w), AM1_E, ASA_H, apol, AM1_Eele	0,978	0,956	0,214
3	(Konstan), vol, AM1_HF, AM1_dipole, glob, logS, AM1_HOMO, logP(o/w), AM1_E, ASA_H, AM1_Eele	0,976	0,952	0,198
4	(Konstan), vol, AM1_HF, AM1_dipole, glob, logS, AM1_HOMO, AM1_E, ASA_H, AM1_Eele	0,973	0,947	0,192
5	(Konstan), vol, AM1_HF, AM1_dipole, glob,	0,967	0,935	0,195

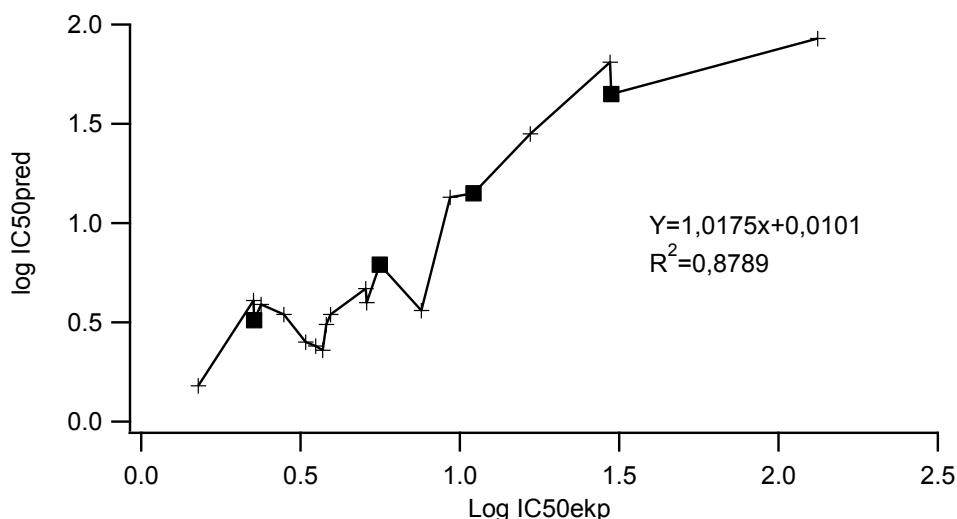
6	logS, AM1_E, ASA_H, AM1_Eele (Konstan), AM1_HF, AM1_dipole, glob, logS, AM1_E, ASA_H, AM1_Eele	0,955	0,912	0,214
7	(Konstan), AM1_HF, AM1_dipole, glob, logS, AM1_E, AM1_Eele	0,949	0,901	0,213
8	(Konstan), AM1_HF, AM1_dipole, logS, AM1_E, AM1_Eele	0,930	0,865	0,236
9	(Konstan), AM1_HF, AM1_dipole, AM1_E, AM1_Eele	0,913	0,833	0,250
10	(Konstan), AM1_HF, AM1_E, AM1_Eele	0,887	0,786	0,272

Model HKSA yang akan terpilih harus dapat memenuhi semua kriteria statistik yang digunakan dan memiliki deskriptor yang spesifik yang mewakili parameter hidrofobik, elektronik, dan sterik. Beberapa kriteria statistik yang harus dipenuhi adalah nilai $R > 0,8$; nilai $R^2 \geq 0,8$; $F_{hitung} / F_{tabel} > 1$ dan $q^2 \geq 0,5$. Dari 10 model persamaan pada Tabel 2, model persamaan 8 yang memiliki nilai $R = 0,930$, nilai $R^2 = 0,865$, $F_{hitung}/F_{tabel} = 3,84$ dengan jumlah deskriptor 5 yang mewakili parameter hidrofobik, elektronik, dan sterik. Selanjutnya, model 8 yang telah terpilih divalidasi untuk membuktikan apakah model terpilih tersebut benar-benar merupakan model persamaan HKSA yang valid dan prediktif.

Validasi persamaan HKSA

Model 8 yang telah diperoleh dari analisis regresi multilinear kemudian divalidasi menggunakan teknik validasi

silang (*cross validation*). Cara pengujian teknik validasi silang yaitu dengan menerapkan *Leave One Out* (LOO) menggunakan kriteria q^2 . Dengan teknik LOO, setiap senyawa yang digunakan dihilangkan data aktivitas eksperimennya dalam analisis regresi multilinear. Hasil dari analisis regresi tersebut kemudian dihitung nilai q^2 nya. Nilai q^2 semakin baik jika mendekati satu. Persamaan dikatakan dapat diterima jika nilai $q^2 \geq 0,5$ (Tropsha, 2010). Setelah dilakukan analisis, diperoleh nilai q^2 dari model persamaan 8 yaitu 0,54. Hasil tersebut menunjukkan bahwa model 8 dapat telah valid dan dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} prediksi dari senyawa *test set*. **Gambar 2** menunjukkan grafik hubungan antara nilai IC_{50pred} versus $\log IC_{50eks}$ untuk senyawa pada training set dan senyawa test set dan nilai koefisien korelasi sebesar 0,8789 yang mengindikasikan bahwa model 8 yang dipilih valid baik secara internal maupun secara eksternal.



Gambar 2. Grafik log IC₅₀pred versus log IC₅₀eks untuk senyawa pada *training set* (tanda plus) dan senyawa *test set* (tanda kotak).

Bentuk matematis persamaan HKSA terpilih adalah :

$$\text{LogIC}_{50} = 6,4301130 + 0,1074397(\text{AM1_dipole}) + 0.0001182(\text{AM1_E}) + -0,0000096(\text{AM1_Eele}) + -0,0073190(\text{AM1_HF}) + 0,0936594(\log S).$$

Kesimpulan

Pada penelitian ini telah diperoleh suatu model HKSA untuk senyawa turunan meisoindigo yang dapat digunakan untuk desain turunan baru dari senyawa meisoindigo dengan aktivitas penghambatan CDK4 yang lebih baik. Persamaan HKSA terpilih adalah: $\text{LogIC}_{50} = 6,4301130 + 0,1074397(\text{AM1_dipole}) + 0.0001182(\text{AM1_E}) + -0,0000096(\text{AM1_Eele}) + -0,0073190(\text{AM1_HF}) + 0,0936594(\log S)$. Persamaan HKSA

tersebut telah divalidasi secara internal dan secara eksternal menggunakan *test set*, sehingga dapat digunakan untuk desain senyawa inhibitor baru CDK4 yang lebih poten dan selektif.

Daftar Pustaka

Chiou, C., Wei C.L., Jiahn H.L., Jing J.C., Lie C.L., Chih Y.C., dkk., 2015. Synthesis and Evaluation Of 3-Ylideneoxindole Acetamides as Potent Anticancer Agents. *European Journal Of Medicinal Chemistry*. **98(1)**.

Depkes RI., 2009. *Buku Saku Pencegahan Kanker Leher Rahim dan Kanker Payudara*. Depkes RI. Jakarta.

Hawkins, D.M., Basak, S.C., Mills, D., 2003. Assessing model fit by cross-validation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 579–586.

Molecular Operating Environment (MOE), 2009.10; Chemical Computing Group Inc., Canada, 2009.

SPSS Inc (2001) SPSS for Windows, Version 11.0.1. SPSS Inc, Chicago.

Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Molecular Informatics*. 2010; 29: 476-488.

WHO., 2012. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>. 19 April 2016.

