

## Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas (HKSA) dan Penambatan Molekul Senyawa Turunan Benzamida sebagai Inhibitor Alosterik *Mitogen Enhanced Kinase* (MEK)

## Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) and Molecular Docking Studies of Benzamide Derivatives as Allosteric Inhibitor of Mitogen Enhanced Kinase (MEK)

Muhammad Arba<sup>1</sup>, Ruslin<sup>1</sup>, Nursan<sup>2</sup>, Maulidiyah<sup>2</sup>, Daryono Hadi Tjahjono<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari 93232, Indonesia.

<sup>2</sup>Jurusan Kimia, Universitas Halu Oleo, Kendari 93232, Indonesia.

<sup>3</sup>Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung 40132, Indonesia.

Email: [arba\\_muh@yahoo.com](mailto:arba_muh@yahoo.com)

Received: March 2018; Revised: April 2018; Accepted: April 2018; Available Online: May 2018

### Abstrak

Jalur sinyal protein kinase Ras-Raf-MEK-ERK adalah salah satu target penting dalam penemuan obat antikanker. Senyawa turunan benzamida diketahui berpotensi sebagai inhibitor alosterik *Mitogen Enhanced Kinase* (MEK). Pada penelitian ini dilakukan studi hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas (HKSA) dan penambatan molekul pada 30 senyawa turunan benzamida sebagai inhibitor alosterik MEK untuk mendapatkan senyawa baru turunan benzamida yang lebih poten sebagai inhibitor alosterik MEK. Perhitungan 13 deskriptor molekul yang mewakili parameter sterik, hidrofobik dan elektronik dilakukan dengan perangkat lunak MOE 2009.10, sedangkan analisis regresi multi linear dengan SPSS 19.0 digunakan untuk mencari hubungan antara variabel bebas (deskriptor molekul) dengan variabel terikat (aktivitas penghambatan senyawa pada MEK). Model HKSA terbaik yang diperoleh adalah  $pIC_{50} = 14.229 - 0.00001(AM1\_E) + 0.043(ASA\_H) + 33.609(Glob) - 0.648(Log S) - 0.047(Vol)$  dengan kriteria statistik  $R=0.965$ ;  $R^2=0.931$ ;  $F_{hitung}/F_{tabel}= 17.693$ , dan  $q^2 = 0.8897$ . Desain senyawa baru dilakukan menggunakan model HKSA tervalidasi dan diperoleh 2 senyawa baru turunan benzamida, C1, dan C2, yang memiliki aktivitas lebih baik dari senyawa induk. Studi penambatan molekul menunjukkan bahwa kedua senyawa baru tersebut mampu berinteraksi pada sisi alosterik protein MEK melalui ikatan hidrogen dan ikatan van der Waals dengan residu-residu asam amino krusial protein MEK. Penelitian ini mengindikasikan bahwa kedua senyawa baru yang didesain dapat ditindaklanjuti pada studi penemuan obat yang menargetkan MEK pada sisi alosterik.

**Kata kunci:** Benzamida, HKSA, kanker, MEK, penambatan molekul.

### Abstract

The Ras-Raf-MEK-ERK protein kinase signaling pathway is important target in the anticancer drug discovery. Benzamide derivatives are known for their potential as allosteric inhibitor of *Mitogen Enhanced Kinase* (MEK). In the current study, the quantitative structure-activity relationship (QSAR) and molecular docking on 30 benzamide derivatives as allosteric inhibitor of mitogen enhanced kinase (MEK) was performed to search for novel more potent benzamide derivatives as allosteric inhibitor of MEK. Molecular descriptor was calculated using MOE 2009.10, while multilinear regression analysis was performed using SPSS version 19.0 to search for relationship between independent variable (molecular descriptor) and dependent variable (MEK inhibition activity of compound). The obtained QSAR model was  $pIC_{50} = 14.229 - 0.00001(AM1\_E) + 0.043(ASA\_H) + 33.609(Glob) - 0.648(Log S) - 0.047(Vol)$ , with statistical criteria  $R=0.965$ ;  $R^2=0.931$ ;  $F_{calc}/F_{table}= 17.693$ , and  $q^2 = 0.8897$ . Designing new compound of benzamide derivatives was performed using the validated QSAR model and the result showed that two compounds, C1, and C2, had better activities than the parent compound. Molecular docking study showed that the two compounds were able to interact with crucial amino acid residues in the allosteric site of MEK through hydrogen bonds and van der Waals interactions. The current study

indicated that the two compounds might be useful to be advanced in the drug discovery process which target MEK on allosteric site.

**Keywords:** Benzamide, cancer, MEK, molecular docking, qsar.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/jkv.v4i1.7545>

## 1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab utama kematian di dunia yang ditandai dengan pembelahan sel yang terus-menerus tanpa henti. Salah satu metode pengobatan kanker adalah dengan penggunaan obat-obatan kimia (kemoterapi) (<http://www.who.int/cancer>, 2018). Saat ini tengah berkembang kemoterapi bertarget yang diharapkan dapat meminimalisir efek samping yang diakibatkan interaksi obat dengan sel normal. Kemoterapi bertarget diharapkan akan lebih efektif karena dapat memblokir jalur spesifik yang berhubungan dengan karsinogenesis dan pertumbuhan sel kanker (Ishii *et al.*, 2013). Salah satu jalur persinyalan sel yang penting adalah jalur sinyal Ras-Raf-MEK-ERK yang sering terderegulasi pada sel kanker khususnya pada melanoma kutan. Melanoma kutan adalah bentuk paling agresif dari kanker kulit yang menyebabkan sekitar 75% kematian akibat kanker kulit (Siegel *et al.*, 2016). Diketahui mutasi yang mengaktifasi jalur Ras-Raf-MEK-ERK terjadi pada lebih dari 90% melanoma kutan sehingga jalur tersebut menjadi target penting dalam pengembangan obat melanoma (Rice *et al.*, 2012; Roskoski, 2017).

Disregulasi jalur sinyal Ras-Raf-MEK-ERK umumnya disebabkan oleh mutasi pada protein Raf atau Ras (terutama B-Raf dan K-Ras), dan jarang ditemukan mutasi pada protein MEK (Roskoski, 2017). Karena itu peneliti giat mengembangkan inhibitor Ras dan Raf, diantaranya dengan ditemukannya Vemurafenib (Roche/Plexxikon) dan Dabrafenib (GSK), yang keduanya disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk pengobatan melanoma (Samatar dan Polikakos, 2014). Namun penggunaan inhibitor Ras dan Raf telah menimbulkan resistensi pada pasien sehingga para peneliti menjajaki kemungkinan penargetan protein *Mitogen Enhanced Kinase* (MEK) sebagai target obat melanoma (Zhao dan Adjei, 2014).

Protein *Mitogen Enhanced Kinase* (MEK) yang merupakan bagian integral dari

jalur sinyal Ras-Raf-MEK-ERK berperan penting dalam mengatur proses seluler termasuk proliferasi, kelangsungan hidup, diferensiasi, apoptosis, dan metabolisme, yang diaktifkan oleh berbagai kelompok sinyal ekstraseluler seperti faktor pertumbuhan dan hormon (Asati *et al.*, 2016). Penargetan MEK memiliki dua alasan utama. Yang pertama, sebagai salah satu titik penting pada jalur sinyal Ras-Raf-MEK-ERK, penghambatan MEK secara teoritis akan memblokir jalur sinyal tersebut. Yang kedua, MEK berbeda dari protein kinase lain terutama pada kantung alosterik yang terletak berdekatan dengan sisi pengikatan ATP, sehingga membuka peluang untuk penghambatan yang lebih selektif dibanding inhibitor kinase lainnya yang terutama bekerja pada sisi pengikatan ATP (Roskoski, 2017). Dengan kedua alasan tersebut, para peneliti telah berusaha menemukan inhibitor MEK dan beberapa diantaranya telah diuji klinis seperti CI-1040 dan PD325901 (Pfizer), namun masalah efikasi dan sifat farmakokinetik yang kurang baik serta efek samping seperti gangguan penglihatan masih menjadi tantangan untuk penggunaannya secara klinis (Heald *et al.*, 2012; Samatar dan Poulidakos, 2014; Roskoski, 2017; Rusconi *et al.*, 2012). Hal ini mengindikasikan kebutuhan untuk penemuan inhibitor MEK yang baru dengan efikasi dan tingkat keamanan yang lebih baik.

Mekanisme kerja inhibitor MEK seperti CI-1040, PD325901, dan AZD6244 pada sisi alosterik yang berdekatan dengan sisi aktif bersifat non-kompetitif (Aoki *et al.*, 2013; Rusconi *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2016;). Pengikatan senyawa pada sisi alosterik tersebut menginduksi perubahan konformasi MEK sehingga enzim tersebut berada dalam bentuk tidak aktif. Hal ini menjadi dasar mengapa penargetan MEK pada sisi alosterik bersifat lebih spesifik dibanding inhibitor enzim kinase yang bekerja pada sisi aktif protein sehingga inhibitor alosterik diharapkan dapat digunakan secara klinis dengan lebih baik (Caunt *et al.*, 2015). Hartung *et al.* (2016) telah meneliti sejumlah senyawa turunan benzamida yang

bekerja melalui mekanisme penghambatan MEK secara alosterik yang diindikasikan mempunyai aktivitas sebagai penghambat pertumbuhan kanker otak. Namun, evaluasi secara *in vivo* senyawa turunan benzamida tersebut menunjukkan sifat fisikokimia dan parameter farmakokinetik yang kurang baik sehingga tidak cukup baik digunakan sebagai obat serta memiliki aktivitas yang rendah terhadap target (Hartung *et al.*, 2016; Hartung *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017).

Pada penelitian ini, dilakukan studi Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA) pada senyawa turunan benzamida untuk mencari hubungan antara sifat-sifat molekuler (deskriptor) dengan aktivitas biologisnya sebagai inhibitor MEK secara alosterik. Deskriptor digunakan sebagai parameter terseleksi dalam mengkaji sifat-sifat molekul. Penelitian ini bertujuan mendapatkan

persamaan HKSA yang valid yang selanjutnya digunakan untuk desain senyawa baru berbasis benzamida. Senyawa desain dari model HKSA terpilih dipelajari interaksinya dengan protein target melalui studi penambatan molekul (*molecular docking*) (Ambarwati *et al.*, 2017; Azis *et al.*, 2016).

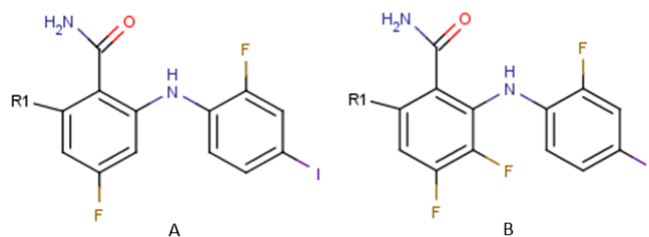
## 2. METODE PENELITIAN

### Metode Komputasi (Data Set)

Sebanyak 30 senyawa turunan benzamide (**Tabel 1** dan **Gambar 1**) sebagai inhibitor alosterik MEK diambil dari literatur (Hartung *et al.*, 2016). Aktivitas penghambatan dalam IC<sub>50</sub> dari 30 senyawa diubah ke dalam bentuk pIC<sub>50</sub> dimana pIC<sub>50</sub> = -Log IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> senyawa dalam data set tersebar dari 10 nM sampai 1900 nM.

**Table 1.** Senyawa turunan benzamida

No.	Senyawa	R1	IC <sub>50</sub> (nM)
1	A1	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	14
2	A2	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	21
3	A3	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	15
4	A4	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-F-5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	94
5	A5	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4,6-F-5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	118
6	A6	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-CH <sub>3</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	262
7	A7	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-Cl-5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	345
8	A8	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-OCH <sub>3</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	592
9	A9	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	1900
10	A10	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4,5-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	127
11	A11	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -6-CH <sub>3</sub>	15
12	A12	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -6-Cl	18
13	A13	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -6-Br	32
14	A14	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -2-CH <sub>3</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	899
15	A15	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -3-OCH <sub>3</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	941
16	A16	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -6-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	81
17	A17	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-F-6-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	107
18	A18	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-CH <sub>3</sub> -6-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	379
19	A19	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	32
20	A20	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	11
21	A21	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-CH <sub>2</sub> -NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	37
22	B22	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	12
23	B23	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	15
24	B24	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	13
25	B25	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10
26	B26	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-F-5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	14
27	B27	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-CH <sub>2</sub> -NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	21
28	B28	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	22
29	B29	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4,6-F-5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	28
30	B30	O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -5-NH-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -6-CH <sub>3</sub>	14



**Gambar 1.** Struktur senyawa turunan benzamida

### Identifikasi Senyawa Pencilan (*outlier*)

Senyawa pencilan yaitu senyawa yang nilai aktivitasnya berada di luar daerah kurva distribusi normal, karena itu biasanya sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, senyawa pencilan dieliminasi dari data set. Identifikasi senyawa pencilan dilakukan dengan menghitung nilai *studentized deleted residual*, dimana senyawa dianggap sebagai pencilan jika memiliki nilai *studentized deleted residual* lebih tinggi dari 2 atau lebih rendah dari -2. Selanjutnya senyawa dikelompokkan ke dalam *training set* yang digunakan untuk membangun model HKSA, dan *test set* yang digunakan untuk validasi eksternal model HKSA yang telah dibangun.

### Optimasi Geometri Senyawa dan Perhitungan Deskriptor

Pada setiap dari 30 senyawa, dilakukan optimasi geometri menggunakan perangkat lunak Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2009) dengan metode semi empiris Austin-Model 1 (AM1). Selanjutnya pada setiap struktur senyawa yang telah dioptimasi dilakukan perhitungan nilai deskriptor menggunakan perangkat lunak Molecular operating environment (MOE 2009.10, lisensi ITB). Adapun deskriptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah momen dipol (AM1\_Dipol), energi total (AM1\_E), energi elektronik (AM1\_Eele), panas pembentukan (AM1\_HF), energi HOMO/*Highest Occupied Molecular Orbital* (AM1\_HOMO), energi LUMO/*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (AM1\_LUMO), polaritas atom total (Apol), luas permukaan hidrofobik (ASA\_H), kelarutan dalam air (Log S), koefisien partisi (Log P), globularitas (Glob), refraktivitas molar (Mr), dan volume van der Waals (Vol). Pemilihan ke-13 deskriptor tersebut dilakukan dengan mempertimbangkan sifat elektronik, sifat hidrofobitas, dan sifat sterik senyawa, yang ketiganya menentukan farmakokinetika dan farmakodinamika obat.

### Membangun Model HKSA

Model HKSA dibangun dengan menggunakan analisis regresi multi linear dengan bantuan perangkat lunak SPSS versi 19. Model HKSA menghubungkan deskriptor sebagai variabel bebas (X) dan nilai pIC<sub>50</sub> aktivitas penghambatan MEK sebagai variabel terikat. Validitas model HKSA diuji dengan kriteria statistik, seperti koefisien korelasi ( $R^2$ ), nilai F, dan nilai *standard error of estimate* (SEE) (Dearden dkk., 2009). Disamping itu, validasi internal juga dilakukan dengan metode *leave-one-out* (LOO) *cross validation* dengan menghitung nilai koefisien validasi silang tersebut ( $q^2$ ). Pada metode LOO-CV, setiap senyawa dalam *training set* dieliminasi dan aktivitas biologisnya diprediksi menggunakan persamaan yang dibangun dari senyawa lain dalam *training set*. Nilai  $q^2$  dihitung menggunakan rumus berikut:

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \dots\dots\dots [1]$$

Dimana  $y$  aktivitas eksperimen senyawa  $i$ ,  $\hat{y}$  adalah aktivitas prediksi senyawa  $i$ , dan  $\bar{y}$  adalah aktivitas eksperimen rata-rata. Nilai  $q^2 > 0.5$  disyaratkan agar sebuah model dianggap valid (Golbraikh dan Tropsha, 2002). Di samping itu, model HKSA yang telah dibangun, juga harus diuji dengan validasi eksternal menggunakan senyawa *test set*. Menurut Golbraikh *et al.* (2003) dan Tropsha dkk. (2003), nilai koefisien validasi eksternal  $R^{2\text{pred}} > 0.6$  adalah indikasi bahwa model yang dibangun valid.

### Desain Senyawa Baru dan Penambatan Molekul

Desain senyawa baru dilakukan dengan cara penambahan substituen pada senyawa aktif yang dipilih. Senyawa aktif dipilih dari senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan paling tinggi pada protein MEK yaitu senyawa 27 dengan IC<sub>50</sub> 14 nM. Desain

senyawa baru ini dilakukan dengan substitusi pada cincin benzena rantai samping (gugus R). Substituen dipilih dengan menggunakan pendekatan skema *Topliss* pada model HKSA Hansch untuk substitusi aromatik pada posisi yang berbeda-beda.

Studi penambatan molekul dilakukan dengan bantuan perangkat lunak yang diunduh dengan gratis yaitu AutoDock 4.2 (Morris dkk., 1998) pada protein MEK yang strukturnya didownload dari Protein Data Bank dengan kode akses 1S9J (Ohren *et al.*, 2004). Sisi aktif protein dibuat mengikuti sisi pengikatan ligan alami (BBM) dengan lebar grid 50 x 50 x 50 pada sisi X Y Z dengan grid point spacing 0.375 Å. Penambatan molekul dilakukan sebanyak 50 kali pengulangan. Parameter lain digunakan mengikuti nilai *default*. Visualisasi hasil penambatan molekul dilakukan dengan *Discovery Studio Visualizer* 2016.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi HKSA awali dengan optimasi geometri setiap senyawa pada data set lalu dilakukan penentuan senyawa pencilan menggunakan nilai *studentized deleted residual*. Hasil penelitian menyatakan bahwa terdapat 3 senyawa pencilan dengan nilai *studentized deleted residual* kurang dari -2 atau lebih besar dari 2, yaitu S14, S23, dan S22, sebagaimana ditampilkan pada Tabel 2. Ketiga senyawa tersebut selanjutnya dieliminasi dari data set. Selanjutnya, senyawa data set (27 senyawa) dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu *training set* (20 senyawa) dan *test set* sebanyak 7 senyawa, S15, S6, S4, S13, S2, S11, dan S24. Pemilihan senyawa *test set* dengan memperhatikan sebaran nilai  $pIC_{50}$  pada seluruh rentang data set. **Tabel 2** menampilkan senyawa pencilan dan senyawa *test set*.

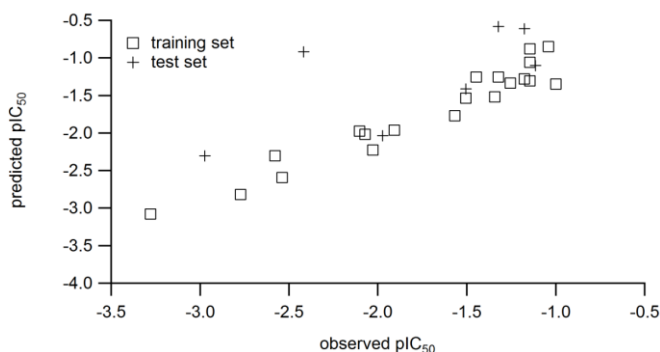
Selanjutnya, senyawa *training set* yang terdiri dari 20 senyawa digunakan pada analisis regresi multilinear untuk membangun model HKSA. Hasil analisis regresi kemudian dikompilasi dan dirangking berdasarkan parameter statistik yang meliputi koefisien korelasi ( $R$ ), koefisien determinasi ( $R^2$ ), nilai Fischer ( $F$ ), dan nilai standart error of estimate ( $SEE$ ). Dengan memperhatikan kriteria statistik dan juga jumlah deskriptor pada model HKSA yang dihasilkan, maka dipilih satu model HKSA seperti pada persamaan (2).

**Tabel 2.** Nilai *studentized deleted residual* setiap senyawa dan dan pembagian data set. Senyawa dengan tanda \* adalah senyawa pencilan dan senyawa dengan tanda \*\* adalah senyawa *test set*.

Senyawa	$pIC_{50}$	Studentized Delete Residual
S9	-3.279	-0.167
S15**	-2.974	-1.040
S14*	-2.954	-2.139
S8	-2.772	-0.097
S18	-2.579	-1.659
S7	-2.538	-2.0
S6**	-2.418	-1.044
S10	-2.104	0.846
S5	-2.072	-0.629
S17	-2.029	0.468
S4**	-1.973	-0.530
S16	-1.908	0.517
S21	-1.568	1.864
S13**	-1.505	0.439
S19	-1.505	0.356
S29	-1.447	-0.385
S28	-1.342	0.752
S2**	-1.322	-0.613
S27	-1.322	0.815
S12	-1.255	0.603
S3	-1.176	0.429
S11**	-1.176	0.541
S23*	-1.176	2.926
S1	-1.146	0.653
S26	-1.146	0.025
S30	-1.146	0.363
S24**	-1.114	0.203
S22*	-1.079	-2.863
S20	-1.041	-0.545
S25	-1.000	1.307

Model HKSA tersebut telah memenuhi beberapa kriteria statistik, yaitu nilai koefisien validasi silang  $q^2$  sebesar 0.8897; nilai  $R^2$  sebesar 0.931;  $F_{hitung}/F_{tabel} = 17.693$ ; dan nilai SEE 0.203, yang mengindikasikan bahwa model tersebut valid. **Tabel 3** menampilkan deskriptor dan parameter statistik model HKSA terpilih.

$$pIC_{50} = 14.229 - 0.00001(AM1\_E) + 0.043(ASA\_H) + 33.609(Glob) - 0.648(Log S) - 0.047 (Vol) \quad [2]$$



**Gambar 2.** Hubungan antara nilai  $pIC_{50}$  prediksi dengan nilai  $pIC_{50}$  eksperimen senyawa turunan benzamida.

**Tabel 3.** Deskriptor dan parameter statistik model HKSA terpilih

Deskriptor	$q^2$	$R$	$R^2$	Adjusted $R^2$	Standard Error of estimate (SEE)
AM1_E, ASA_H, Glob, Log S, Vol	0.8897	0.965	0.931	0.905	0.203

Menurut model HKSA di atas, aktivitas penghambatan senyawa dipengaruhi oleh deskriptor energi total (AM1\_E), luas permukaan hidrofobik (ASA\_H), globularitas (Glob), kelarutan dalam air (Log S), dan volume van der Waals (Vol). Model tersebut mengindikasikan kontribusi positif AM1\_E, Log S, dan Vol, serta kontribusi negatif ASA\_H and Glob, terhadap aktivitas penghambatan MEK senyawa turunan benzamida. Hal ini berarti penurunan nilai ASA\_H dan Glob senyawa turunan benzamida akan meningkatkan aktivitas penghambatannya pada MEK. Selain itu, diketahui dari model HKSA tersebut, deskriptor yang paling berpengaruh adalah Globularitas (Glob).

Realibilitas model selanjutnya dinilai dengan validasi eksternal menggunakan senyawa *test set* dengan menghitung nilai koefisien korelasi prediksi ( $R^{2pred}$ ). Hasil analisis menunjukkan bahwa model tersebut memiliki nilai  $R^{2pred} = 0,70$ , yang mengindikasikan bahwa model HKSA yang dibangun valid (Golbraikh and Tropsha, 2002; Ruslin *et al.*, 2017). Hubungan antara nilai  $pIC_{50}$  prediksi versus  $pIC_{50}$  eksperimen ditampilkan pada **Gambar 2**.

### Desain Senyawa Baru dan Penambatan Molekul

Desain senyawa baru turunan benzamida dilakukan menggunakan persamaan HKSA yang diperoleh dengan cara

penambahan substituen pada senyawa induk pada gugus benzena rantai samping (gugus R) (Ruslin *et al.*, 2017). Hal ini berdasarkan penelitian Hartung *et al.*, (2016) yang menyatakan bahwa modifikasi struktur senyawa turunan benzamida pada bagian benzensulfamida akan menghasilkan perubahan profil farmakologi. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 2 senyawa yaitu C1 dan C2 yang memiliki aktivitas penghambatan MEK lebih baik dari senyawa induk. **Gambar 3** menampilkan struktur senyawa induk (*parent compound*), senyawa desain C1, dan C2.

Selanjutnya, studi penambatan molekul pada protein MEK (kode PDB: 1S9J) dilakukan untuk melihat interaksi ligan dengan protein target. Validasi penambatan molekul dilakukan dengan *redocking* ligan alami (BBM, **Gambar 3**) dan diperoleh nilai RMSD kedua struktur 1.38 Å yang mengindikasikan bahwa prosedur penambatan molekul yang dilakukan valid (Morris *et al.*, 1998). **Gambar 4** menunjukkan penghimpitan (*overlay*) konformasi ligan alami (BBM) antara sebelum dan setelah penambatan molekul.

Interaksi ligan alami (BBM) dengan MEK didukung oleh ikatan hidrogen antara gugus hidroksil ligan dengan gugus amino rantai utama Gly80, atom oksigen ligan dengan gugus amino rantai samping Lys97, gugus karbonil ligan dengan gugus amino rantai samping Lys97, gugus hidroksil ligan dengan

gugus amino rantai samping Lys97, gugus fluorobenzene dengan gugus amino rantai utama Val211 dan Ser212. Selain itu residu asam amino Val127, Met143, dan Phe209 teramati berinteraksi van der Waals dengan ligan alami (BBM). Diketahui Lys97, Phe209, Ser212, dan Met143, adalah residu krusial dalam sisi aktif MEK (Hartung, 2015).

Interaksi ligan alami (BBM) dengan MEK didukung oleh ikatan hidrogen antara gugus hidroksil ligan dengan gugus amino rantai utama Gly80, atom oksigen ligan dengan gugus amino rantai samping Lys97, gugus karbonil ligan dengan gugus amino rantai samping Lys97, gugus hidroksil ligan dengan gugus amino rantai samping Lys97, gugus fluorobenzene dengan gugus amino rantai utama Val211 dan Ser212. Selain itu residu asam amino Val127, Met143, dan Phe209 teramati berinteraksi van der Waals dengan ligan alami (BBM). Diketahui Lys97, Phe209, Ser212, dan Met143, adalah residu krusial dalam sisi aktif MEK (Ohren *et al.*, 2004).

Selanjutnya, interaksi senyawa induk dengan protein MEK juga didukung oleh beberapa ikatan hidrogen dengan residu asam amino penting pada sisi aktif MEK. Ikatan hidrogen gugus fluorobenzene ligan teramati dengan gugus amino rantai samping Lys97, gugus amino benzamida dengan oksigen rantai utama Ser212, atom oksigen karbonil dengan gugus amino rantai utama Val211, gugus amino sulfonamide dengan gugus karbonil rantai utama Ile216, dan oksigen sulfonamide dengan gugus amino rantai utama Arg234.

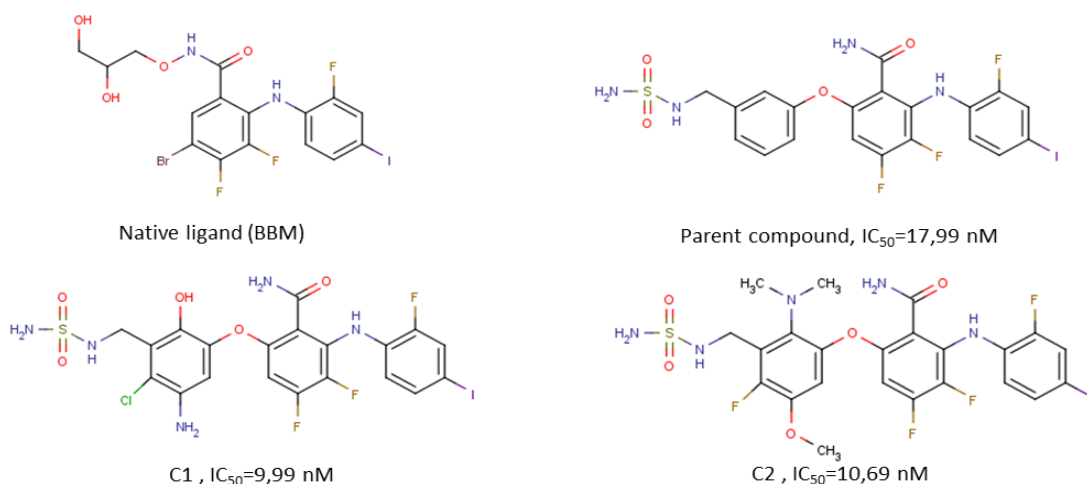
Interaksi yang mirip teramati pada ligan C10, dimana gugus amino benzamida

berinteraksi melalui ikatan dengan hidrogen dengan oksigen karbonil rantai utama Val127. Sedangkan gugus amino benzamida membentuk ikatan hidrogen dengan rantai utama Asp208 dan Phe209.

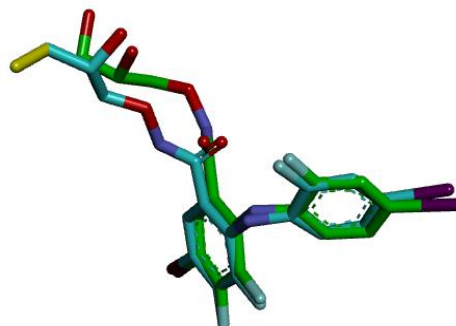
Interaksi ikatan hidrogen antara gugus fluorobenzene dengan gugus amino rantai utama Val211 dan Ser 212 terlihat pada ligan C25. Selain itu, ikatan hidrogen juga terbentuk antara gugus klorobenzena dengan gugus amino rantai samping Arg234, sedangkan gugus amino sulfonamide membentuk ikatan hidrogen dengan atom oksigen rantai utama Arg189 dan Asp190.

Pada setiap konformasi ligan senyawa induk, C10, dan C25, residu asam amino yang berinteraksi melalui ikatan van der Waals mirip, seperti Lys97, Phe209, Ser212, dan Met143. **Gambar 5** menampilkan interaksi setiap ligan dengan protein MEK.

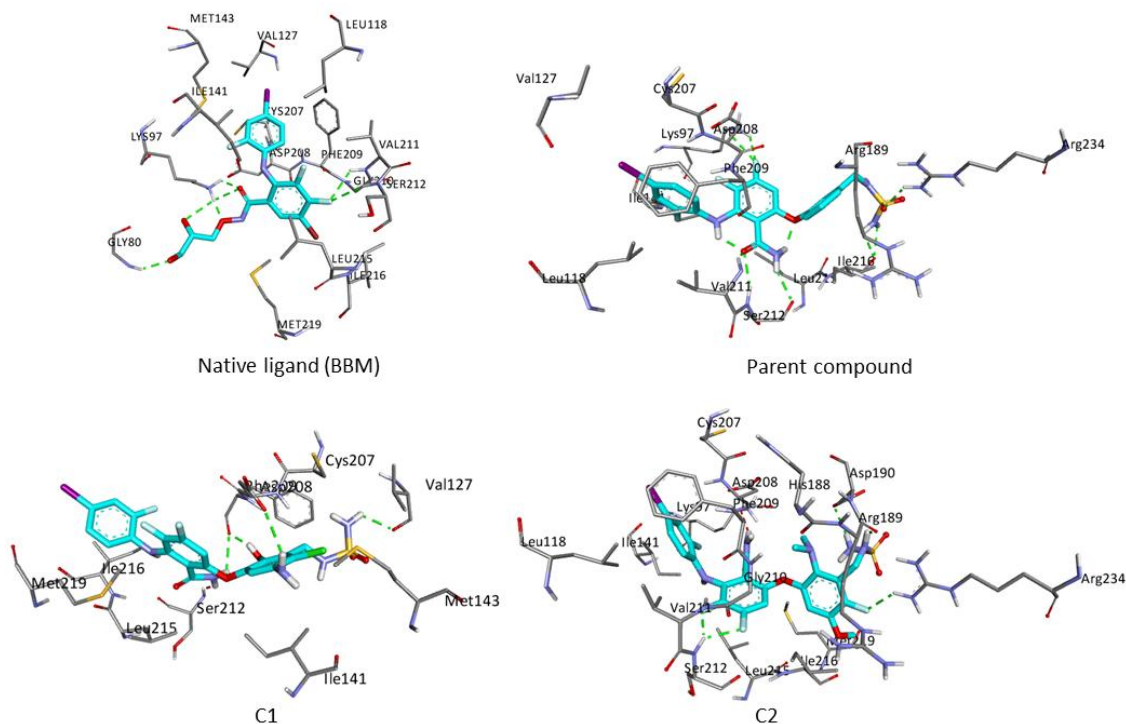
Selain prediksi modus pengikatan ligan pada sisi aktif protein target, studi penambatan molekul juga mampu memprediksi afinitas ikatan setiap ligan yang direpresentasikan dalam bentuk energi ikatan. Pada penelitian ini, energi ikatan senyawa induk, senyawa desan C10, dan C25, berurutan-turut adalah  $-10.78$  kkal/mol,  $-9.84$  kkal/mol, dan  $-8.68$  kkal/mol. Namun, pada banyak studi diindikasikan bahwa metode penambatan molekul dengan AutoDock sangat baik digunakan untuk prediksi modus pengikatan ligan, namun kurang akurat untuk prediksi afinitas, sehingga data-data energi ikatan di atas tidak mencerminkan afinitas ligan yang sebenarnya (Arba *et al.*, 2017).



**Gambar 3.** Struktur senyawa ligan alami (BBM), senyawa induk, C1, dan C2.



**Gambar 4.** Penghimpitan senyawa ligan alami (BBM) antara konformasi sinar-X (warna hijau) dan konformasi hasil penambatan molekul (warna biru).



**Gambar 5.** Interaksi ligan alami (BBM), senyawa induk, C1, dan C2 pada sisi pengikatan protein MEK. Garis hijau putus-putus adalah ikatan hidrogen.

#### 4. SIMPULAN

Pada penelitian ini telah dibangun sebuah model HKSA valid yang menghubungkan struktur kimia senyawa turunan benzamida dengan aktivitas penghambatannya terhadap MEK. Desain senyawa baru menggunakan model HKSA tersebut diperoleh 2 senyawa baru dengan aktivitas prediksi yang lebih baik dari senyawa induk. Studi penambatan molekul menunjukkan bahwa senyawa yang didesain mampu berinteraksi pada sisi alosterik protein MEK dengan residu-residu asam amino krusial melalui ikatan hidrogen maupun ikatan van der

Waaals. Penelitian ini mengindikasikan bahwa senyawa yang didesain dapat dijadikan sebagai acuan untuk pengembangan inhibitor alosterik MEK.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih pada Dr. Muhammad Yusuf atas kontribusinya dalam analisis penambatan molekul.

#### DAFTAR PUSTAKA

Ambarwati Y, Martoprawiro MA, Mulyani I, Ismunandar, Onggo D. 2017. Docking



- interaction of protein tyrosine phosphatase and complex chromium(III) nicotinate compounds. *Jurnal Kimia VALENSI*. 3(2): 89-94.
- Aoki T, Hyohdoh I, Furuichi N, Ozawa S, Watanabe F, Matsushita M, Sakaitani M, Ori K, Takashi K, Harada N, Tomii Y, Tabo M, Yoshinari K, Aoki Y, Shimma N, Iikura H. 2013. The sulfamide moiety affords higher inhibitory activity and oral bioavailability to a series of coumarin dual selective RAF/MEK inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23: 6223–6227.
- Arba M, Ruslin, Ihsan S, Wahyudi ST, Tjahjono DH. 2017. Molecular modeling of cationic porphyrin-anthraquinone hybrids as DNA topoisomerase II $\beta$  inhibitors. *Computational Biology and Chemistry*. 71: 129–135. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2017.10.002.
- Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. 2016. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 109: 314-341.
- Azis FK, Nukitasari C, Oktavianingrum FA, Ariyati LW, Santoso B. 2016. Hasil *in silico* senyawa Z12501572, Z00321025, SCB5631028 dan SCB13970547 dibandingkan turunan zerumbon terhadap *human liver glycogen phosphorylase* (115Q) sebagai antidiabetes. *Jurnal Kimia VALENSI*. 2(2): 120-124.
- Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. 2015. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nature review of cancer*. 15: 577-592.
- Dearden JC, Cronin MTD, Kaiser KLE. 2009. How not to develop a quantitative structure–activity or structure–property relationship (QSAR/QSPR). *SAR QSAR in Environmental Research*. 20: 241–266.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ. 2009. Gaussian 09, Revision B.01. Wallingford CT (USA): Gaussian Inc.
- Golbraikh A, Shen M, Xiao Z, Xiao YD, Lee KH, Tropsha, A. 2003. Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. *Journal of Computer Aided Molecular Design*. 17: 241–253.
- Golbraikh A, Tropsha A. 2002. Beware of q<sup>2</sup>! *Journal of Molecular Graphics and Modeling*. 20(4): 269–276.
- Hartung IV, Hammer S, Hitchcock M, Neuhaus R, Scholz A, Siemeister G, Bohlmann R, Hiling RC, Puhler F. 2016. Optimization of allosteric MEK inhibitors. Part 2: Taming the sulfamide group balances compound distribution properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 26: 186-193.
- Hartung IV, Hitchcock M, Pühler F, Neuhaus R, Scholz A, Hammer S, Petersen K, Siemeister G, Brittain D, Hillig RC. 2013. Optimization of allosteric MEK inhibitors. Part 1: Venturing into underexplored SAR territories. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23: 2384–2390.
- Heald RA, Jackson P, Savy P, Jones M, Gancia E, Burton B, Newman R, Boggs J, Chan E, Chan J, Choo E, Merchant M, Rudewicz P, Ultsch M, Wiesmann C, Yue Q, Belvin M, Price S. 2012. Discovery of novel allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK) 1,2 inhibitors possessing bidentate Ser212 interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55: 4594-4604.
- <http://www.who.int/cancer/media/news/cancer-key-facts/en> (diakses tanggal 4 April 2018).
- Ishii N, Harada N, Joseph EW, Ohara K, Miura T, Sakamoto H, Matsuda Y, Tomii Y, Tachibana-Kondo Y, Iikura H, Aoki T, Shimma N, Arisawa M, Sowa Y, Poulikakos PI, Rosen N, Aoki Y, Sakai T. 2013. Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK

- inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity. *Cancer Research*. 73(13): 4050-4060.
- Liu Y, Cai P, Wang N, Zhang Q, Chen F, Shi L, Zhang Y, Wang L, Hu L. 2017. Combined blockade of Tim-3 and MEK inhibitor enhances the efficacy against melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 484: 378-384.
- Molecular Operating Environment (MOE), Version 2009.10, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada.
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Molecular Modeling*. 19: 1639-1662.
- Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, Yan C, McConnell P, Spessard C, Banotai C, Mueller WT, Delaney A, Omer C, Sebolt-Leopold J, Dudley DT, Leung IK, Flamme C, Warmus J, Kaufman M, Barrett S, Teclé H, Hasemann CA. 2004. Structures of human MAP kinase kinase (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology*. 11: 1192-1197.
- Rice KD, Aay N, Anand NK, Blazey CM, Bowles OJ, Bussenius J, Costanzo S, Curtis JK, Defina SC, Dubenko L, Engst S, Joshi AA, Kennedy AR, Kim AI, Koltun ES, Loughheed JC, Manalo JL, Martini JF, Nuss JM., Peto CJ, Tsang TH, Yu P, Johnston S. 2012. Novel carboxamide-based allosteric MEK Inhibitors: Discovery and optimization efforts toward XL518 (GDC-0973). *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 3: 416-421.
- Roskoski RJr. 2017. Allosteric MEK1/2 inhibitors including cobimetanib and trametinib in the treatment of cutaneous melanomas. 2017. *Pharmacological Research*. 117: 20-31.
- Rusconi P, Caiola E, Brogginini M. 2012. RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology. *Current Medicinal Chemistry*. 19: 1164-1176.
- Ruslin, Nirwana, Arba M, Mukhsar, Tjahjono DH. 2017. QSAR, Molecular docking and dynamics studies of pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives as bruton's tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 7(12): 001-007.
- Samatar AA, Poulikakos PI. 2014. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 13: 928-942.
- Shang J, Lu S, Jiang Y, Zhang J. 2016. Allosteric modulators of MEK1: drug design and discovery. *Chemical Biology and Drug Design*. 88: 485-497.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2016. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinician*. 66: 7-30.
- Tropsha A, Gramatica P, Gombar VK. 2003. The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR Combinatorial Science*. 22: 69-77.
- Zhao Y, Adjei AA. 2014. The clinical development of MEK inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 11: 385-400.