

Penambatan molekul (E)-N-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida pada COX-2 secara *in silico*, uji aktivitas sitotoksik *in vitro* dan uji antitumor *in vivo*

Nuzul Wahyuning DIYAH¹⁾, Hadi POERWONO, Juni EKOWATI^{1*)}

¹ Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

^{*)} Corresponding Author, Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286, e-mail : j.ekowati@yahoo.com

ABSTRAK

Senyawa (E)-N-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida (AFMS) adalah hasil konjugasi molekul *p*-aminofenol (PAF) dan asam-*p*-metoksisinamat (APMS) dengan memanfaatkan material awal etil *p*-metoksisinamat (EPMS) hasil isolasi dari *Kaempferia galanga* Linn. Konfirmasi struktur dilakukan dengan metode spektroskopi IR, NMR-¹H dan MS. Tujuan penelitian ini adalah merancang senyawa yang mempunyai afinitas lebih tinggi pada COX-2 dan mempunyai aktivitas antitumor. Penambatan molekul diuji secara *in silico* pada enzim COX-2 (PDB. 3LN1). Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan *Brine Shrimp Lethality test* terhadap *Artemia salina* dan aktivitas antitumor diuji pada tumor yang diinduksi benzo(a)pirena pada mencit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konjugasi molekul menjadi AFMS meningkatkan afinitas terhadap COX-2. Nilai skor tambat untuk AFMS, PAF, APMS, dan EPMS berturut-turut adalah -90,22; -74,04; -51,57 dan -84,85 kkal/mol. Senyawa AFMS memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *Artemia salina* dengan LC₅₀= 13,59 ppm dan mampu menghambat pertumbuhan tumor pada mencit lebih kuat dibanding etil *p*-metoksisinamat pada dosis 40 dan 80 mg/kg. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa AFMS mempunyai aktivitas antitumor berdasarkan potensi interaksinya dengan COX-2.

Kata kunci: (E)-N-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida, penambatan molekul, COX-2, *brine shrimp lethality test*, antitumor

ABSTRACT

(E)-N-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide (AFMS) is the conjugation product of *p*-aminophenol (PAF) and *p*-methoxycinnamic acid (APMS), which was prepared from ethyl *p*-methoxycinnamate (EPMS) a starting material isolated from *Kaempferia galanga* Linn. Structural confirmation was carried out by IR, NMR-¹H and MS spectroscopy methods. The purpose of this study is to design compound that have a higher affinity for COX-2 and possesses antitumor activity. Molecular docking study *in silico* was performed on the COX-2 enzyme (PDB. 3LN1). Cytotoxic activity was determined by Brine Shrimp Lethality test against *Artemia salina* and the antitumor activity was tested on tumors induced by benzo(a)pyrene in mice. The results showed that conjugation of the two molecules into AFMS increased the affinity for COX-2. The docking score values (RS) for AFMS, PAF, APMS, and EPMS were -90.22; -74.04; -51.57 and -84.85 kcal/mol respectively. AFMS showed cytotoxic activity against *Artemia salina* with LC₅₀= 13.59 ppm and was able to inhibit tumor growth in mice more strongly than ethyl *p*-methoxycinnamic at doses of 40 and 80 mg/kg. This study concluded that AFMS had antitumor activity based on its potential interaction with COX-2.

Key words: N-(4-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol, docking, COX-2, Brine Shrimp Lethality Test, Anticancer.

PENDAHULUAN

N-asetil-*p*-aminofenol (parasetamol) adalah senyawa turunan aminofenol yang telah menjadi obat analgesic dan dikenal mempunyai aktivitas antipiretik yang tinggi tetapi aktivitas antiinflamasinya rendah. Sedangkan senyawa-senyawa antiinflamasi non steroid (NSAID) mempunyai aktivitas antiinflamasi yang tinggi tetapi sering menimbulkan efek samping yang signifikan pada lambung. Efek samping ulserogenik dari NSAID dihubungkan dengan keasaman senyawa NSAID oleh adanya gugus karboksilat.

Gugus hidroksi di posisi *para* dari gugus amino dalam struktur parasetamol berperan bagi aktivitas analgesik dan juga toksisitasnya, karena isomer N-asetil-*m*-aminofenol tidak bersifat hepatotoksik dan juga tidak aktif sebagai analgesik. Terdapat penelitian yang melaporkan bahwa turunan amidofenol yang disintesis dari *p*-aminofenol dan beberapa senyawa NSAID menunjukkan peningkatan aktivitas antipiretik dibandingkan parasetamol dengan mempertahankan

aktivitas antiinflamasi NSAID induknya. Senyawa-senyawa ini tidak menimbulkan ulserogenesis seperti obat induknya (Yadav *et al*, 2006).

Aktivitas antiinflamasi NSAID disebabkan oleh penghambatan enzim siklooksigenase-2 (COX-2), sedangkan banyak efek samping yang tidak diinginkan dari NSAID (misalnya, perdarahan gastrointestinal) disebabkan oleh penghambatan COX-1. Oleh karena itu, lebih diinginkan obat yang memiliki aktivitas lebih tinggi terhadap COX-2 (Waldman, 2009).

Dewasa ini para peneliti memusatkan perhatian pada proses penghambatan pertumbuhan sel kanker, baik yang melalui induksi apoptosis atau pencegahan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) (Meiyanto *et al.*, 2008). Studi epidemiologis dan eksperimental telah menunjukkan efek obat NSAID dalam pencegahan kanker pada manusia. COX-2, isoenzim kunci dalam konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin, diinduksi oleh berbagai agen seperti faktor pertumbuhan dan promotor tumor, dan

sering diekspresikan berlebihan dalam berbagai tumor (Rigas and Kashfi, 2005). Kontribusi COX-2 terhadap karsinogenesis dan fenotip ganas sel tumor terkait dengan kemampuannya antara lain untuk menghambat apoptosis, mempromosikan angiogenesis, memodulasi peradangan dan fungsi kekebalan tubuh. Sejumlah uji klinis menggunakan penghambat COX-2 sedang berlangsung, baik dalam rangka pengobatan maupun pencegahan kanker (Xiao-Chun, 2002).

Penghambat COX-2 yang beredar di perdagangan, terutama golongan coxib, dapat digunakan sebagai kemopreventif kanker yang bersifat proapoptotik dan menghambat angiogenesis (Koki dan Masferrer, 2002), tetapi senyawa-senyawa golongan ini mempunyai efek samping protrombosis dan berbahaya karena meningkatkan kejadian infark miokardial (Dilber *et al*, 2008). Hal ini mendorong dilakukannya penelitian sintesis obat penghambat COX-2 yang efek sampingnya lebih rendah.

Etil-*p*-metoksisinamat (EPMS) adalah konstituen utama dari rimpang tanaman *Kaempferia galanga*. Senyawa ini mengandung gugus-gugus yang berpotensi menghasilkan beberapa aktivitas biologis, antara lain analgesik (Sadono dan Hasmono, 2001), antiinflamasi (Sulaiman *et al*, 2008; Umar *et al.*, 2012) dan antibakteri (Omar *et al.*, 2014). Etil-*p*-metoksisinamat yang diperoleh dari ekstrak metanol *K. galanga* L. sangat sitotoksik terhadap sel HeLa (Kosuge *et al.*, 1985). Selain itu, EPMS menunjukkan potensi antikarsinogenik yang relatif kuat dalam studi *in vitro* (Xue dan Chen, 2002). Namun demikian, ada yang melaporkan bahwa EPMS dapat berpartisipasi dalam interaksi obat dan herbal, serta meningkatkan resiko toksisitas dan karsinogenesis kimia dari obat dan senyawa yang dimetabolisme melalui CYP1A1, CYP2B, dan CYP2E1 (Sirisangtragul, 2011).

EPMS adalah ester dari asam *p*-metoksisinamat (APMS). Telah dilaporkan bahwa APMS mempunyai aktivitas antinospasmodik yang lebih tinggi dibanding aspirin berdasarkan *whirling test* (Ekowati dan Diyah, 2013). APMS dapat dipreparasi dari hidrolisis EPMS.

Berdasarkan kajian data tersebut, dalam penelitian ini dilakukan konjugasi molekul *p*-aminofenol dan asam-*p*-metoksisinamat, yang sama-sama berpotensi tinggi sebagai senyawa aktif. Konjugasi terjadi antara gugus OH pada *p*-aminofenol dengan gugus C=O karboksilat dari molekul APMS. Konjugasi dua molekul ini secara teoritis akan meningkatkan aktivitasnya dan dapat menghilangkan efek yang merugikan dari masing-masing molekul. Untuk mengetahui potensinya sebagai penghambat COX-2, dilakukan penambatan molekul (*docking*) senyawa terhadap enzim siklooksigenase-2 (PDB. 3LN1 (PDB. 3LN1). Senyawa hasil konjugasi diuji aktivitas sitotoksiknya secara *in vitro* dengan *Brine shrimp lethality test* (BST) dan dilanjutkan secara *in vivo* menggunakan model tumor terinduksi benzo(a)pirena pada mencit, dalam rangka mengembangkan potensinya sebagai senyawa antikanker.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan kimia yang digunakan berderajat pro analisis, antara lain: *p*-aminofenol, piridin p.a., etanol, tetrahidrofur (THF), trietilamina (Et₃N), tionil klorida, kloroform (CHCl₃), *n*-heksana, benzena, KOH, dan asam klorida (HCl).

Alat-alat

Peralatan yang digunakan meliputi berbagai alat gelas serta alat penunjang untuk keperluan pemisahan dan pemurnian hasil reaksi. Untuk penentuan titik lebur digunakan Fischer-John Melting Point apparatus, untuk konfirmasi struktur digunakan Spektrofotometer Jasco FT/IR 5300, spektrometer ¹H-NMR Bruker, dan HR-MS JEOL JMS-600.

Untuk uji penambatan molekul secara *in silico* digunakan laptop ASUS yang didukung oleh prosesor intel core-i5 dan dilengkapi program-program: ChemDraw Pro 15.0, IBM SPSS statistics 21, dan Molegro Virtual Docker (MVD) ver 5.0.

Prosedur

A. Preparasi material awal

Isolasi etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari ekstrak rimpang kencur. Rimpang kencur diperoleh dari Kebun Balai Materia Medika. Rimpang dicuci dan dan dibersihkan, kemudian diiris tipis dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang (Natta *et al.*, 2008). Irisan rimpang kering digiling menjadi serbuk, kemudian dilakukan ekstraksi dengan cara perkolasi menggunakan 5 kg serbuk rimpang kering yang direndam dengan ±5L etanol 96% dalam tabung perkolator selama semalam. Ekstrak dialirkan perlahan dan ditampung dalam labu Erlenmeyer hingga diperoleh perkolat 2,5 L, kemudian dipekatkan sampai 500 ml. Perkolat pekat didinginkan hingga terbentuk kristal putih kecoklatan. Kristal disaring dan dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam Kiesel gel 60 Merck dan fase gerak *n*-heksana-etil asetat (5:2).

Isolat yang diperoleh diuji kemurniannya dengan pemeriksaan titik lebur dan kromatografi lapisan tipis (KLT). Konfirmasi struktur isolat dilakukan dengan alat spektrofotometer Infra Merah (IR) dan spektrometer ¹H-NMR

Preparasi asam *p*-metoksisinamat (APMS).

Preparasi APMS dilakukan dengan cara hidrolisis EPMS 48,5 mmol dalam 50 ml etanol 96%, kemudian ditambahkan 25 ml larutan 5% KOH-etanol menurut prosedur yang telah dilaporkan sebelumnya (Ekowati dkk, 2007). Kristal diuji kemurniannya dengan pemeriksaan titik lebur dan KLT, kemudian dilakukan konfirmasi struktur kristal secara spektrometri.

Preparasi *p*-metoksisinamoid klorida dari APMS. Larutan APMS 1 g dalam benzena kering dan 1 tetes piridin ditambah 2,4 eq. tionil klorida, kemudian campuran direfluks semalam dalam kondisi gas N₂. Kelebihan tionil klorida dan pelarut

dihilangkan dengan *rotary evaporation* sehingga dihasilkan zat padat kuning. *p*-metoksisinamoil klorida yang terbentuk disimpan dalam gas N₂.

B. Konjugasi molekul

300 mg (2,479 mmol) *p*-aminofenol (PAF) dalam 10 ml THF ditambah Et₃N, kemudian ditetesi larutan *p*-metoksisinamoil klorida 1,75 mmol dalam 10 ml THF secara perlahan-lahan pada suhu 0 °C, N₂ atm. Reaksi dilanjutkan pada suhu kamar selama 16 jam, kemudian campuran reaksi diuapkan dengan penurunan tekanan. Residu yang terbentuk ditambah air suling dan diaduk sekitar 30 menit sampai diperoleh padatan. Zat padat yang terbentuk disaring, dicuci dengan CHCl₃, diaduk lagi selama 1 jam, disaring, kemudian dikeringkan.

Setelah dilakukan rekristalisasi, dilakukan penentuan titik lebur dan uji KLT. Struktur kimia senyawa hasil konjugasi diidentifikasi dengan Spectrometer resonansi magnetik inti proton (¹H-NMR), dan spectrometer massa HR-MS.

C. Penambatan molekul secara *in silico*

Target penambatan molekul adalah enzim siklooksigenase-2 (PDB. 3LN1). Struktur kristal makromolekul enzim COX-2 dengan resolusi 2,40 Å diunduh dari RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). 3LN1 adalah struktur kristal COX-2 yang mengikat ligan asal CEL (selekoksib), senyawa penghambat COX-2.

Struktur 3 dimensi molekul ligan dan sifat fisikokimianya (log P, E_{final}, MR) disiapkan dengan program ChemDraw Pro 15.0. Geometri molekul ligan dioptimasi menggunakan metode MMFF94 untuk mencapai tingkat energi minimal, kemudian struktur molekul disimpan dalam format sybyl mol2.

Molegro Virtual Docker (MVD) 5.0 digunakan untuk penambatan molekul. Struktur tiga dimensi (3D) 3LN1 dimasukkan ke dalam *workspace* program MVD dan ditentukan tempat ikatannya (*active site*). Struktur 3D molekul konjugat (AFMS) sebagai ligan uji diletakkan ke dalam *active site* dengan cara align pada ligan asal, CEL. Penambatan molekul ligan pada COX-2 dilakukan menggunakan algoritma SE MolDock dengan iterasi maksimum 1500.

Afinitas ligan-enzim ditentukan dari skor tambat yang dinyatakan dalam *Rerank Score* (RS). Kompleks ligan-enzim (*pose*) dengan energi bebas paling rendah (*pose* dengan skor tertinggi) menunjukkan model interaksi yang paling baik. Validasi *binding mode* dilakukan dengan melakukan *re-docking* ligan asal terhadap *active site*. *Pose* dengan energi paling rendah diamati secara visual, yang meliputi: jenis interaksi antara ligan dan enzim, serta asam-asam amino yang terlibat dalam interaksi.

D. Uji Sitotoksik dengan Metode BST

Penetasan telur *Artemia salina*. Pada suhu kamar, telur *Artemia salina* (1g/1L) dimasukkan ke

dalam wadah dari kaca, yang berisi air laut dengan salinitas 5-150 ppt, pH 7,0-8,5, dan diberi sistem aerasi. Suhu dijaga 28-30 °C dan aerasi dilakukan kontinyu selama 24 jam sehingga telur menetas dan *nauplii* terpisah dari kulit telur dan siap digunakan untuk pengujian.

Pembuatan Larutan Uji. Dibuat 2 macam larutan uji, yaitu EPMS dan konjugat (AFMS). Dari masing-masing senyawa dibuat larutan induk konsentrasi 500 ppm dalam pelarut etanol. Dari larutan induk dibuat 5 macam konsentrasi yang berbeda, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 500 ppm, dalam wadah vial transparan yang telah dikalibrasi volumenya (5 mL). Sejumlah volume tertentu larutan induk dimasukkan vial dan diuapkan pelarutnya. Kemudian ditambahkan 4 mL air laut, diaduk homogen, serta dicek pH dan suhunya. Sebagai larutan kontrol adalah 50,0 µL DMSO yang ditambah 4 mL air laut, diaduk homogen serta dicek pH dan suhunya.

Pelaksanaan uji. Sebanyak 10 ekor *nauplii* dimasukkan ke dalam masing-masing vial dari 5 larutan uji dan 1 larutan kontrol. Kemudian ditambahkan air laut sampai volume 5,0 mL dan dihomogenkan kembali. Setelah 24 jam, *nauplii* yang masih hidup dalam tiap tabung diamati menggunakan kaca pembesar. Kematian *nauplii* dipastikan dari tidak adanya gerak maju *nauplii* selama 30 detik pengamatan (Apu *et al.*, 2010). Konsentrasi larutan uji yang menyebabkan 50% kematian *nauplii* setelah 24 jam terpapar larutan uji dinyatakan dalam LC₅₀ (mM), yang dihitung dengan analisis regresi probit pada derajat kepercayaan 95% menggunakan IBM SPSS statistics 21.

D. Uji Aktivitas Antitumor

Mencit jantan 60 ekor yang telah diadaptasi, dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, yaitu:

- 1) Kelompok I.1, diberi senyawa uji AFMS dosis 40 mg/kg BB,
- 2) Kelompok I.2, diberi senyawa uji AFMS dosis 80 mg/kg BB,
- 3) Kelompok II.1, diberi senyawa uji EPMS dosis 40 mg/kg BB,
- 4) kelompok II.2 diberikan senyawa uji EPMS dosis 80 mg/kg BB,
- 5) kelompok III, kelompok diberi celoxib 20 mg/kg BB sebagai kontrol positif.
- 6) Kelompok IV adalah kontrol negatif, hanya diberi CMC-Na;

Mencit dalam semua kelompok diinduksi mengalami tumor dengan pemberian injeksi larutan benzo(a)piren 0,6 mg/0,2 mL dalam oleum olivarum secara subkutan pada daerah scapular sebanyak 5 kali, yang diberikan tiap dua hari sekali. Mencit juga diberi senyawa uji setiap hari selama satu bulan. Seluruh mencit dipelihara dalam suasana dan diet yang sama selama 2 bulan.

Pengamatan makroskopis pertumbuhan tumor pada mencit dilakukan setiap hari selama 2 bulan. Pertumbuhan tumor ditandai oleh adanya benjolan (daging tumbuh) pada daerah tengkuk.

Aktivitas hambatan terhadap pertumbuhan tumor ditentukan dari presentasi tingkat kejadian tumor pada mencit di setiap kelompok, dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ insiden tumor} = \frac{\text{jumlah mencit kena tumor}}{\text{jumlah mencit dalam kelompok}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Material awal

Hasil isolasi EPMS. Dari rimpang kencur diperoleh 2,4% EPMS, yang berbentuk kristal jarum, tidak berwarna, bau aromatis dan rasa agak pedas. Jarak lebur isolat tersebut 46-47 °C.

Berdasarkan data spektroskopi diperoleh informasi sebagai berikut: IR (KBr) 3007, 2980, 2935, 1705, 1630, 1602, 1253, 1209, 829 cm^{-1} ; NMR- ^1H (CDCl_3) 3,82 (3H, s); 6,96 (1H, d, $J = 15,9\text{ Hz}$); 6,88 (2H, d, $J = 8,8\text{ Hz}$); 6,96 (1H, d, $J = 15,9\text{ Hz}$); 7,46 (2H, d, $J = 8,8\text{ Hz}$); 4,24 (2H, m, $J = 7,2\text{ Hz}$); 1,32 (3H, t, $J = 7,2\text{ Hz}$). IR (KBr) 3007, 2980, 2935, 1705, 1630, 1602, 1253, 1209, 829 cm^{-1} .

Hasil preparasi APMS. Hidrolisis EPMS dengan pereaksi KOH/etanol menghasilkan 80% APMS, berbentuk kristal jarum, tidak berwarna, tidak berbau dan menyebabkan lidah terasa tebal. Senyawa mempunyai titik lebur 169 °C.

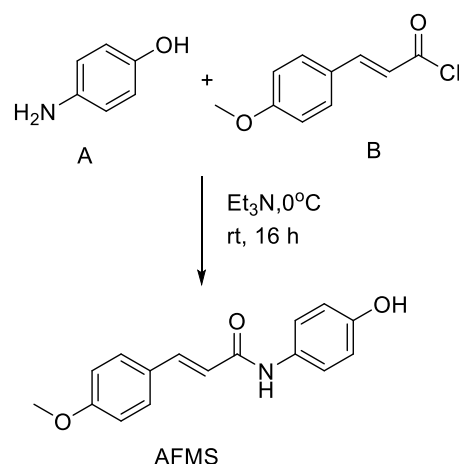
Berdasarkan pemeriksaan spektroskopi diperoleh data sebagai berikut: ^1H -NMR (DMSO) 3,78 (3H, s), 6,60 (1H, d, $J = 16\text{ Hz}$), 6,96 (2H, d, $J = 5,0\text{ Hz}$), 7,53 (1H, d, $J = 16\text{ Hz}$), 7,62 (2H, d, $J = 5,0\text{ Hz}$). IR (KBr) 2937, 2843, 2567, 1685, 1624, 1288, 1255 cm^{-1} .

Hasil preparasi *p*-metoksinamoil klorida. Diperoleh *p*-metoksinamoil klorida dari APMS dalam persentase hasil 90%, berupa zat padat kuning pucat, titik lebur 51°C). Data analisis spektroskopi: ^1H -NMR (CDCl_3): 3,87 (3H, s), 6,51 (1H, d, $J = 15,2\text{ Hz}$), 6,96 (2H, d, $J = 5,0\text{ Hz}$), 7,53 (1H, d, $J = 16\text{ Hz}$), 7,62 (2H, d, $J = 5,0\text{ Hz}$); HR-MS (EI, m/z): 196,0276 (M^+).

B. Senyawa hasil konjugasi (AFMS)

Senyawa hasil sintesis (Gambar 1), berupa kristal berwarna coklat muda, titik lebur 185°C. Data spektroskopi: IR (KBr) 3308, 3096, 1655, 1508, 1251, 823 cm^{-1} . ^1H -NMR (DMSO) 3,79 (3H, s); 6,63 (1H, d, $J = 15,58\text{ Hz}$); 6,71 (2H, d, $J = 8,86\text{ Hz}$); 6,99 (2H, d, $J = 8,74\text{ Hz}$); 7,61 (1H, d, $J = 15,58\text{ Hz}$); 7,46 (2H, d, $J = 8,86\text{ Hz}$); 7,54 (2H, d, $J = 8,74\text{ Hz}$); 9,86 (1H, s); 10,21 (1H, s). HR-MS (EI, m/z): 269,1075 (M^+).

Berdasarkan data tersebut dikonfirmasi bahwa senyawa AFMS adalah (E)-*N*-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida.



Gambar 1. Reaksi pembentukan senyawa (E)-*N*-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida (AFMS) dari *p*-aminofenol (A) dan *p*-metoksi sinamoil klorida (B)

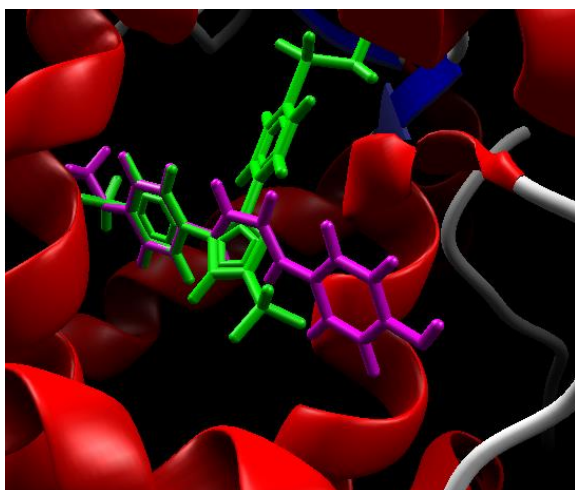
C. Penambatan molekul pada COX-2

Sifat fisikokimia dan hasil penambatan molekul pada enzim COX-2 (PDB. 3LN1), yang berupa skor tambat (*Rerank score* = RS) ditunjukkan pada Tabel 1.

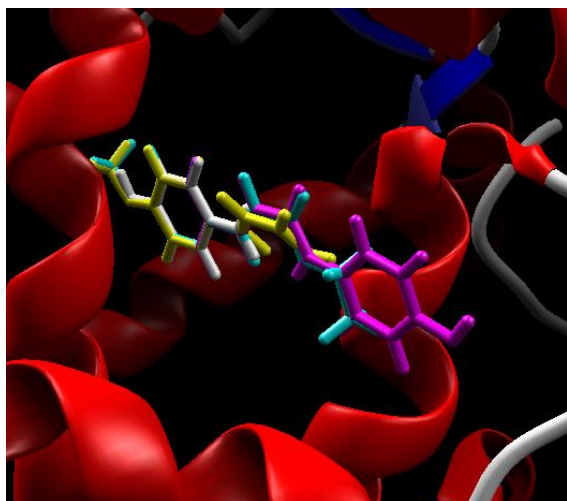
Tabel 1. Sifat fisikokimia dan hasil penambatan molekul pada COX-2 (PDB. 3LN1)

Ligan	Log P	E_{final} (kcal/mol)	MR (cc/mol)	RS (kcal/mol)
AFMS	2,66	7,52	78,40	-90,22
EPMS	2,41	12,32	60,34	-84,85
APMS	1,81	-7,69	50,10	-74,04
PAF	0,84	-3,29	31,92	-51,57

Data tabel 1 menunjukkan bahwa konjugasi *p*-aminofenol (PAF) dan asam-*p*-metoksisinamat (APMS) meningkatkan lipofilisitas (Log P) dan sifat sterik bulk molekul (MR). Secara energetik, geometri molekul-molekul pembentuk AFMS, yaitu APMS dan PAF, lebih mudah terstabilkan, berdasarkan nilai E_{final} masing-masing yang lebih rendah dibanding AFMS. Namun jika dibandingkan dengan EPMS, molekul AFMS lebih mudah mencapai konformasi energi minimum. Perubahan sifat-sifat ini menghasilkan nilai RS ligan yang lebih negatif pada AFMS. RS mewakili energi bebas interaksi ligan-enzim (kcal/mol); makin rendah energi, makin tinggi afinitas ligan terhadap enzim. Dalam hal ini, afinitas senyawa AFMS lebih besar dibanding EPMS, senyawa pembanding aktivitas biologisnya. Dengan demikian diperkirakan aktivitas biologisnya akan lebih tinggi dibanding EPMS. Interaksi molekul AFMS dengan enzim COX-2 ditampilkan pada Gambar 2.



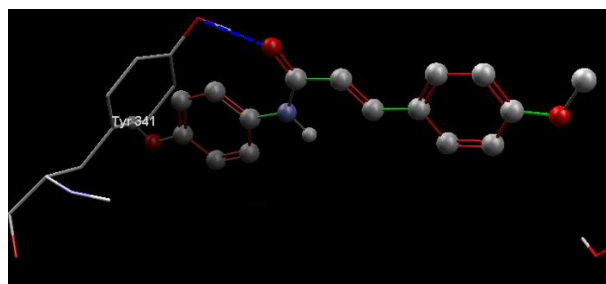
A



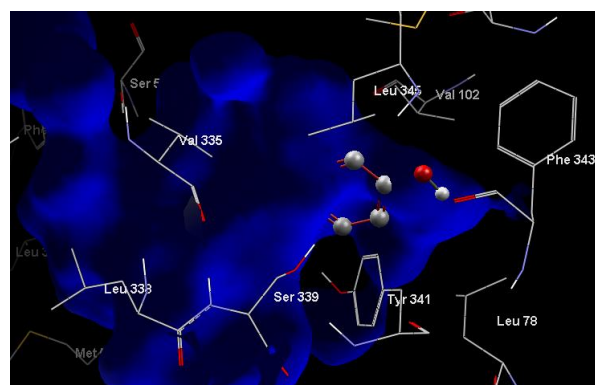
B

Gambar 2. Interaksi molekul AFMS dalam tempat aktif (*cavity-3*) COX-2 (PDB. 3LN1): **(A)**. Tumpang tindih AFMS (warna ungu) dengan ligan asal CEL (warna hijau), **(B)**. Tumpang tindih 4 ligan uji, yaitu AFMS (ungu), APMS (kuning), PAF (putih), EPMS (biru muda).

Afinitas ligan terhadap COX-2 merupakan hasil kontribusi gugus-gugus pada senyawa yang berinteraksi dengan asam-asam amino dalam tempat aktif enzim. Tiga ligan uji, yaitu AFMS, APMS, dan EPMS menunjukkan adanya ikatan hidrogen dan interaksi sterik (van der Waals), sedangkan PAF tidak menunjukkan interaksi tersebut sehingga disimpulkan bahwa *p*-aminofenol tidak berinteraksi dengan COX-2. Interaksi ikatan hidrogen antara AFMS dengan COX-2 dalam 3 dimensi dapat dilihat pada Gambar 3.



A

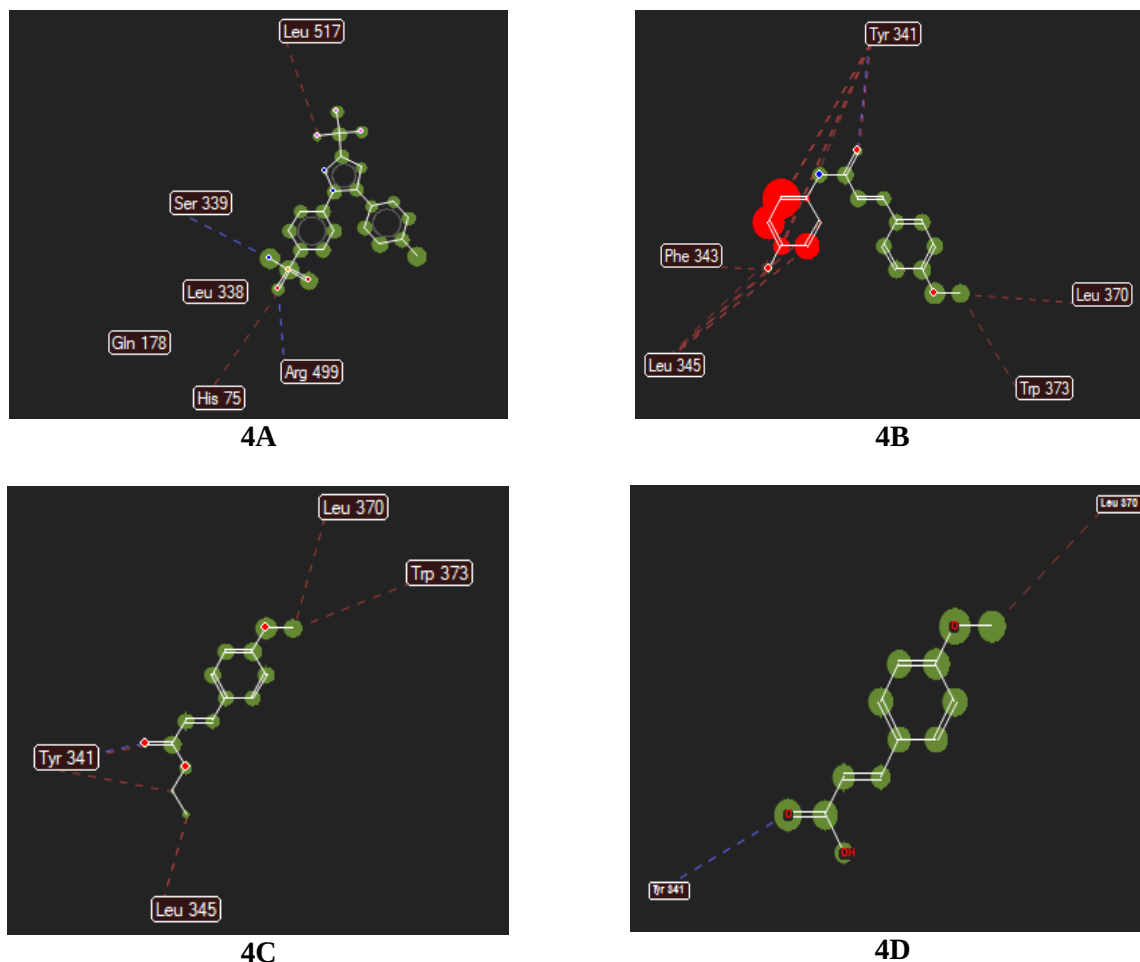


B

Gambar 3. Molekul AFMS dalam *active site* enzim COX-2. **(A)** AFMS membentuk ikatan hidrogen (garis putus warna biru) dengan asam amino Tyr 341 dalam *cavity-3*. Panjang ikatan hidrogen= 2,38 Å, energi= -0,66 kkal/mol, **(B)** sebagian gugus dari molekul AFMS, yaitu gugus OH dan cincin benzena, berada di luar dalam medan elektrostatis *cavity-3*.

Ikatan hidrogen dan interaksi sterik antara 4 ligan, masing-masing dengan asam amino dalam *cavity-3* enzim COX-2 ditampilkan dalam Gambar 4, yaitu: ligan asal CEL (Gambar 4A), ligan uji AFMS (Gambar 4B), APMS (Gambar 4C), EPMS (Gambar 4D).

Berdasarkan Gambar 4, AFMS dan 2 ligan uji lainnya membentuk satu ikatan hidrogen dengan asam amino Tyr 341, sedangkan ligan asal CEL membentuk dua ikatan hidrogen dengan asam amino yang berbeda, yaitu Ser 339 dan Arg 499. Jenis asam amino yang berinteraksi sterik juga berbeda antara ligan uji dengan ligan asal. Disimpulkan bahwa *binding mode* AFMS berbeda dengan ligand asal, tetapi sama dengan 2 ligan uji lainnya, yang merupakan senyawa turunan asam sinamat. Molekul *p*-aminofenol tidak membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen yang terbentuk pada interaksi dengan COX-2 melibatkan gugus karbonil asam sebagai akseptor proton, sedangkan pada senyawa *p*-aminofenol tidak terdapat gugus tersebut.



Gambar 4. Ikatan hidrogen dan interaksi sterik antara ligan dengan asam amino dalam tempat aktif COX-2. Daerah bulat warna hijau menandakan atom/gugus berada dalam *cavity-3*, lingkaran warna merah jingga menunjukkan gugus berada di luar lingkungan hidrofobik dan medan elektrostatis *cavity-3*, tetapi masih di dalam lingkungan tempat aktif. (4A) AFMS, (4B) APMS, (4C) EPMS.

Penggabungan molekul PAF dan APMS mengakibatkan perubahan panjang ikatan hidrogen dan energinya, dari APMS menjadi AFMS. Adanya gugus aminofenol meningkatkan kekuatan ikatan hidrogen dari APMS menjadi AFMS. Panjang ikatan hidrogen AFMS adalah 2,38 Å dan energinya -0,66 kkal/mol, panjang ikatan hidrogen APMS adalah 2,765 Å dan energinya -2,5 kkal/mol, sedangkan EPMS mempunyai panjang ikatan hidrogen 2,37 Å dan energi ikatan -0,60 kkal/mol. Dibandingkan dengan EPMS, kekuatan ikatan hidrogen AFMS relatif lebih tinggi, dengan jarak atom donor dan akseptor lebih dekat 0,01 Å.

Gugus-gugus yang berasal dari senyawa *p*-aminofenol berkontribusi pada bertambahnya interaksi sterik dengan asam-asam amino di luar *cavity-3*, yaitu Phe 343 dan Leu 345, dan meningkatkan interaksi sterik di dalam *cavity-3*, yaitu dengan Tyr 341. Gugus NH, atom C benzena posisi *orto* dari gugus NH, dan gugus OH meningkatkan interaksi dengan Tyr 341, meskipun gugus-gugus tersebut berada di luar *cavity-3*, kecuali NH. Gugus C=O sinamoi juga menambah interaksi sterik dengan Tyr 341.

D. Hasil uji sitotoksik

Hasil skrining dengan metode BST terhadap *Artemia salina* pada dosis 10, 25, 50, 100, 200 ppm yang menghasilkan LC₅₀ ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Respons kematian larva *Artemia salina* pada pemberian senyawa AFMS dan EPMS

Konsentrasi	AFMS		EPMS	
	Larva total	Larva mati	Larva total	Larva mati
1.000	10	5	10	3
1.398	10	6	10	4
1.699	10	7	10	6
2.000	10	8	10	8
2.699	10	10	10	10
LC ₅₀	13,59 ppm		29,03 ppm	

Berdasarkan Tabel 3, senyawa AFMS bersifat lebih toksik daripada EPMS, sehingga akan menghasilkan aktivitas antitumor lebih tinggi.

E. Aktivitas hambatan pertumbuhan tumor

Hasil pengamatan makroskopik yang menghasilkan % pertumbuhan tumor yang diinduksi benzo(a)pirena pada mencit ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Tingkat kejadian tumor pada mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Kelompok Uji	Jumlah mencit	Jumlah mencit terkena tumor	Insiden tumor (%)
AFMS 40 mg/kg	10	4	40
AFMS 80 mg/kg	10	3	30
EPMS 40 mg/kg	10	9	85
EPMS 80 mg/kg	10	7	62
Celebrex 40 mg/kg	10	3	33
Kontrol negatif	10	10	100

Berdasarkan Tabel 3 tersebut diketahui senyawa hasil modifikasi yaitu (E)-N-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksi-fenil)akrilamida pada dosis 40 dan 80 mg/kgBB mempunyai aktivitas antitumor yang hampir sama dengan selekoksib sebagai kontrol positif, yaitu dapat menghambat pertumbuhan tumor antara 60–70%.

Dari hasil penambatan molekul dan uji aktivitas, baik *in vitro* maupun *in vivo* dapat diketahui adanya hubungan antara peningkatan afinitas molekul AFMS terhadap COX-2 dengan aktivitas antitumornya. Berdasarkan penelitian Ekowati dkk. (2009) yang melaporkan aktivitas analgesik-antiinflamasi senyawa N-(4-metoksisinamoyl)-p-aminofenol, seperti halnya senyawa-senyawa NSAID, maka diduga hambatan pertumbuhan tumor oleh AFMS juga melewati hambatan enzim COX-2. Dalam rangka mempelajari mekanisme hambatan pertumbuhan tumor ini, enzim COX-2 merupakan salah satu enzim target. Hal ini sejalan dengan teori yang menyatakan bahwa proses apoptosis dan angiogenesis dipengaruhi oleh COX-2.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa (E)-N-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksi-fenil)akrilamida dapat dipreparasi dari etil p-metoksisinamat. Senyawa mempunyai afinitas tinggi terhadap COX-2 secara *in silico* dan menunjukkan aktivitas antitumor lebih kuat daripada etil p-metoksisinamat, baik berdasarkan uji BST pada *Artemia salina* maupun pada tumor mencit yang diinduksi benzo(a)pirena.

Penelitian mekanisme hambatan pertumbuhan tumor oleh senyawa (E)-N-(4-hidroksifenil)-3-(4-metoksi-fenil)akrilamida dapat diarahkan pada hambatan aktivitas enzim COX-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim Peneliti menyampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Airlangga, Ketua LPPM-Unair, Dekan

Fakultas Farmasi, serta Ketua Departemen Farmasi yang memfasilitasi terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Dilber, S.P, Dobric, SLj., Juranic, Z.D., Markovic, B.D., Vladimirov, S/M., and Juranic, I.O., (2008). Docking Studies and Anti-inflammatory Activity of β -Hydroxy- β -arylpropanoic Acids. *Molecule*. 13, pp.603-615.
- Ekowati, J., Diyah, N.W., (2013). Aktivitas Antinociceptiv dan Uji *In Silico* terhadap Cyclooxygenase dari Asam p-metoksisinamat dan Asam m-metoksisinamat. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 2(1), pp. 32–39.
- Ekowati, J., Suzana, Diyah, N.W., Susilowaty, M.I., Poerwono, H., Rudyanto, M., Astika, G.N, Syahrani, A., Siswono, H., Budiati, T., (2007). Novel Analgesic Compounds from p-hydroxycinnamic acid. *First Collaborative Joint Seminar USM-Unair*, Penang, Malaysia.
- Ekowati, J., Diyah, N.W., Poerwono, H., Siswandono, Budiati, T., Sasaki, S., Yamauchi, T., Higashiyama, K., (2009). Structure Modification of p-methoxycinnamic acid Isolated from *Kaempferia galanga* to Improve its antinociceptive activity. *Second Collaborative Joint Seminar USM-Unair*, Surabaya, Indonesia.
- Koki, A.T., Masferrer, J.M. (2002). Celecoxib: A Specific COX-2 Inhibitor With Anticancer Properties. *Cancer Control*, 9(2) Suppl., pp. 28-35.
- Meiyanto, E., Melanissa, R., Dai', M. (2006). PGV-1 decreases angiogenic factor (VEGF and COX-2) expression on T47D cell induced by estrogen. *Majalah Farmasi Indonesia* 17(1), pp. 1-6.
- Omar, M.N., Hasali, N.H.M., Alfarra, H.Y., Yarmo, M.A., Zuberdi, A.M., (2014). Antimicrobial Activity and Microbial Transformation of ethyl p-methoxycinnamate extracted from *Kaempferia galanga*. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), pp. 1037-1043.
- Rigas, B., Kashfi, K. (2005). Cancer prevention: a new era beyond cyclooxygenase-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, pp. 1–8.
- Sirisangtragul, W., Sripanidkulchai, B. (2011). Effects of *Kaempferia galanga* L. and ethyl-p-methoxycinnamate (EPMC) on hepatic microsomal cytochrome P450s enzyme activities in mice. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 33 (4), pp. 411-417.
- Sadono and Hasmono, D. (2001). The Availability Involve/Profile of Farmakokinetic of Crystal EPMS (The Active Isolate Substance of Powder Rimpang *Kaempferia galanga*) at Rabbit as Animal Researches, *Research Report*. Surabaya: Airlangga University.
- Sulaiman, M.R., Zakaria, Z.A., Daud, I.A., Ng, F.N., Ng.Y.C., Hidayat, M.T. (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aq. Extract

- of *Kaempferia galanga* leaves in animal models. *Natural Med.* 62(2), pp. 221-227.
- Waldman, S.D. (2009). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and the COX-2 Inhibitors. *Pain Review* pp. 630-634
- Xiao-Chun, X. (2002). COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anti-Cancer Drugs.* 13(2), pp.127-137.
- Xue, Y. and Chen, H., 2002. Study on the anti-carcinogenic effects of three compounds in *Kaempferia galanga* L. *Xei Shen Yan Jui.* 31(4), pp. 247-248, 251.
- Yadav, M.R., Nimekar, D.M., Ananthakrishnan, A., Brahmkshatriya, P.S., Shirude, S.T., Giridhar, R., Parmar, A., Balaraman, R. (2006). Synthesis of new chemical entities from paracetamol and NSAIDs with improved pharmacodynamic profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, (24), pp. 8701-8706.