



Studi Dinamika Molekul Stabilisasi Metaloproteinase Matriks 9 oleh Asam Kafeat

(Molecular Dynamics Studies of Matrix Metalloprotenase-9 Stabilization by Caffeic Acid)

Enade Perdana Istyastono

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia.

E-mail: enade@usd.ac.id

Article Info:

Received: 10 Mei 2020

in revised form: 11 Mei 2020

Accepted: 21 Juli 2020

Available Online: 30 September 2020

Keywords:

Metaloproteinase matriks 9

Asam kafeat

Dinamika molekul

YASARA-Structure

Corresponding Author:

Enade Perdana Istyastono

Fakultas Farmasi

Universitas Tadulako

Yogyakarta

55282

Indonesia

email: enade@usd.ac.id

ABSTRACT

Caffeic acid, a catechol-containing phytochemical found in coffee, has been reported as a potent matrix metalloproteinase 9 (MMP9) inhibitor. The IC₅₀ value of caffeic acid as MMP9 inhibitor could reach below 20 nM. The research presented in this article employed molecular dynamics simulations to unravel the atomic mechanism of the MMP9 inhibition by caffeic acid. Molecular dynamics simulations of MMP9 for 10 ns using YASARA-Structure were performed with and without caffeic acid as the studied ligand. The results showed that caffeic acid stabilized the structure of the MMP9.



Copyright © 2019 JFG-UNTAD

This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

How to cite (APA 6th Style):

Istyastono, E.P. (2020). Studi Dinamika Molekul Stabilisasi Metaloproteinase Matriks 9 oleh Asam Kafeat. *Jurnal Farmasi Galenika :Galenika Journal of Pharmacy (e-Journal)*, 6(2), 280-285. doi:10.22487/j24428744.2020.v6.i2.15131

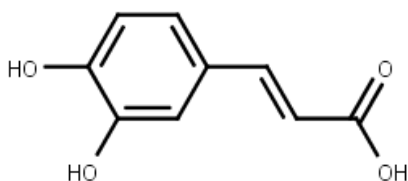
ABSTRAK

Asam kafeat, senyawa fitokimia dengan residu katekol yang ditemukan di kopi, dilaporkan sebagai inhibitor poten pada metaloproteinase matriks 9 (MMP9). Nilai IC_{50} penghambatan MMP9 oleh asam kafeat dilaporkan mencapai kurang dari 20 nM. Penelitian yang dipaparkan pada artikel ini bertujuan mengungkap mekanisme inhibisi MMP9 oleh asam kafeat di tingkat atomik. Simulasi dinamika molekul MMP9 selama 10 ns dilakukan baik tanpa ligan maupun dengan asam kafeat sebagai ligan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam kafeat mampu menstabilkan struktur MMP9.

Kata kunci: Metaloproteinase matriks 9; Asam kafeat; Dinamika molekul; YASARA-Structure

PENDAHULUAN

Asam kafeat merupakan senyawa alami dengan residu katekol dan asam karboksilat yang dihubungkan oleh residu etilena (Gambar 1). Senyawa ini dapat ditemukan pada biji hijau kopi Robusta (*Coffea robusta*) maupun Arabika (*Coffea arabica*) dengan kadar mencapai 6% (Naidu et al., 2008). Kadar ini meningkat pada biji kopi sangrai akibat degradasi asam klorogenat (Królet et al., 2020). Baik asam klorogenat maupun asam kafeat merupakan inhibitor poten pada enzim metaloproteinase matriks 9 (MMP9) dengan nilai IC_{50} secara berturut-turut, 30-50 nM (Jin et al., 2005) dan 10-20 nM (Park et al., 2005).



Gambar 1. Struktur asam kafeat.

Indonesia merupakan penghasil dan eksportir kopi terkemuka di dunia dengan peningkatan konsumsi yang signifikan akhir-akhir ini (Wang & Ghalih, 2017). Di lain pihak, prevalensi luka diabetes di Indonesia juga merupakan tertinggi di dunia (Yusuf et al., 2016). Peningkatan penderita diabetes juga diprediksi meningkat pesat di Indonesia (Guariguata et al., 2014). Enzim MMP9 dilaporkan berperan penting pada proses angiogenesis sel kanker (Jones et al., 2019) dan juga pada lambatnya penyembuhan luka diabet (Hariono et al., 2018). Oleh karena itu, penelitian tentang kegunaan asam kafeat pada kopi sebagai inhibitor MMP9 untuk penyembuhan luka diabetes perlu menjadi perhatian khusus.

Penelitian yang dipaparkan pada artikel ini bertujuan untuk mengungkapkan mekanisme inhibisi aktivitas MMP9 pada tingkat atomik oleh asam kafeat. Teknik penambatan molekul asam kafeat pada model homolog MMP9 (Wicaksono et al., 2020) diikuti dengan simulasi dinamika molekul (*molecular dynamics*/MD) selama 10 ns dilakukan untuk mencapai tujuan tersebut. Asam kafeat terbukti mampu menstabilkan struktur MMP9. Selain itu, luaran dari penelitian ini berupa kompleks MMP9 dengan asam kafeat hasil MD membuka peluang untuk pengembangan protokol penapisan virtual berbasis struktur (PVBS) dengan fokus pada basis data senyawa bahan alam.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Perangkat keras yang digunakan adalah komputer dengan prosesor Intel® Core™ i5-7500 @ 340 GHz, memori 8 GB dan sistem operasi Windows10 64-bit. Perangkat lunak yang digunakan adalah YASARA-Structure 19.12.14 (Krieger & Vriend, 2015). Struktur model homolog lengkap MMP9 terkompleks CC27 (mmp9_final.yob) diunduh dari Mendeley Data DOI: 10.17632/xj7yt48jwb.1

(Wicaksono et al., 2020) digunakan sebagai bahan dasar penambatan molekul dan simulasi MD. Perangkat lunak Microsoft Excel digunakan untuk analisis kuantitatif hasil-hasil simulasi.

Metode

Berkas struktur MMP9 terkompleks CC27 *mmp9_final.yob* unduhan dari Mendeley Data dibuka di YASARA-Structure. Ditambahkan *simulation cell* untuk penambatan molekul dalam bentuk *cubic* dengan jarak 10 Å dari bagian terluar ligan CC27. Setelah penambahan *simulation cell*, ligan dihapus dari sistem dan kemudian sistem simulasi disimpan sebagai *mmp9-asamkafeat_receptor.sce*. YASARA-Structure kemudian di-*restart* untuk konstruksi struktur asam kafeat dengan input berupa format struktur SMILES asam kafeat “C1=CC(=C(C=C1/C=C/C(=O)O)O)O” yang diperoleh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>. Modul BuildSMILES digunakan untuk mengubah struktur SMILES menjadi dalam bentuk tiga dimensi (3D). Dilanjutkan protonasi pada pH 7,4 dengan perintah pada konsol YASARA-Structure berikut “pH value=7.4,update=Yes”. Sebelum ditambatkan dilakukan energi minimisasi dengan pengaturan *default* dan disimpan sebagai *mmp9-asamkafeat_ligand.yob*.

Penambatan molekul menggunakan *macro* YASARA-Structure *dock_run.mcr* dengan pengaturan *default* (Krieger et al., 2002; Krieger & Vriend, 2015). Hasil penambatan terbaik (*mmp9-asamkafeat_001.yob*) kemudian disimpan sebagai *r2md.sce* dan siap sebagai *input file* untuk simulasi MD. Simulasi MD dilakukan pada *folder* MD_WL. Berkas *macro* *md_run.mcr* bawaan YASARA-Structure (Krieger & Vriend, 2015) digunakan untuk *running* simulasi MD setelah dimodifikasi sedikit pada pengaturan *duration* dan *saveinterval* supaya simulasi berjalan 10 ns dengan pengambilan *snapshot* setiap 10 ps, serta penambahan pengaturan *AddSpring* sebagai *constraint* menjaga stabilitas jejaring ikatan ionik dengan kofaktor Zn (Antoni et al., 2013; Hariono et al., 2018). Setelah simulasi MMP9-asam kafeat selesai, dilanjutkan simulasi MD MMP9 saja di *folder* MD_NL. Berkas *r2md.sce* pada MD_WL dikopikan ke MD_NL dan dibuka di YASARA-Structure untuk menghapus atom-atom asam kafeat pada sistem dan disimpan dengan nama *file* yang sama. Simulasi MD dilakukan dengan *macro* yang sama dengan *macro* pada simulasi MD MMP9-asam kafeat.

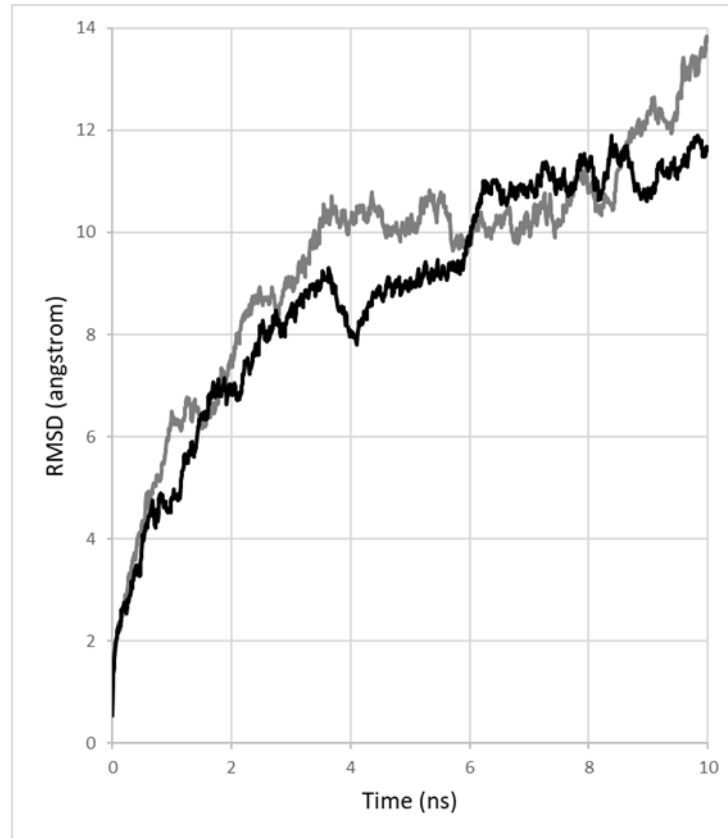
Hasil simulasi MD dianalisis dengan menggunakan *macro* *md_analyze.mcr* bawaan dari YASARA-Structure. YASARA-Structure digunakan untuk melakukan inspeksi visual hasil MD. Microsoft Excel digunakan untuk analisis hasil simulasi secara kuantitatif untuk melakukan perhitungan rerata dan standar deviasi (SD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bertujuan mengungkapkan aktivitas asam kafeat sebagai inhibitor poten MMP9 pada level atomik, penelitian yang dipaparkan pada artikel ini menjalankan simulasi MD selama 10 ns pada struktur utuh human MMP9 tanpa ligan dan struktur utuh human MMP9 dengan asam kafeat sebagai ligan. Sebagai permulaan digunakan model homolog MMP9 dengan CC27 sebagai ligan hasil pemodelan Wicaksono et al. (2020). Stabilisasi struktur *backbone* MMP9 selama proses simulasi dijadikan indikasi aktivitas asam kafeat pada enzim tersebut. Secara objektif, digunakan nilai *root-mean-square deviation* (RMSD) atom-atom *backbone* MP9 pada setiap *snapshot* dibandingkan dengan koordinat *input file*. Patut dicatat, sebagai *input file*, asam kafeat ditambatkan menggantikan struktur CC27 di kantung ikatan, tepatnya pada sisi katalitik dari MMP9. Grafik nilai RMSD disajikan pada Gambar 2.

Secara visual, Gambar 2 menunjukkan asam kafeat menstabilkan atom-atom *backbone* MMP9. Nilai RMSD pada simulasi tanpa asam kafeat meningkat terus, sementara relatif datar pada simulasi dengan asam kafeat, terutama pada 2 ns terakhir. Proses stabilisasi sudah nampak signifikan setelah melalui 4 ns pertama, namun pada 4-8 ns tampak ada lonjakan nilai RMSD pada simulasi dengan asam kafeat, sementara nilai RMSD pada simulasi tanpa asam kafeat tampak relatif datar. Pemilihan waktu simulasi 10 ns ini mengacu pada Liu et al. (2017) yang meneliti stabilitas protein-ligan dengan melihat nilai RMSD *backbone* pada simulasi MD. Namun, hal ini bukan hal yang kaku mengingat bahwa nilai

RMSD *backbone* suatu protein pada simulsi MD juga tergantung dari dimensi protein secara keseluruhan (Sargsyan et al., 2017). Menurut Liu et al. (2017), stabilitas tercapai jika deviasi nilai RMSD pada 5 ns terakhir dalam simulasi MD 10 ns kurang dari 1 Å. Tabel 1 menyajikan beberapa parameter yang teramati pada 5 ns terakhir dalam simulasi MD 10 ns dengan maupun tanpa asam kafeat.



Gambar 2. Kurva nilai RMSD atom-atom *backbone* MMP9 selama simulasi. Kurva berwarna abu-abu merepresentasikan nilai RMSD pada simulasi tanpa asam kafeat, sedangkan kurva hitam merepresentasikan simulasi dengan asam kafeat.

Tabel 1. Beberapa parameter turunan dari nilai-nilai RMSD *backbone* pada 5 ns dan 1 ns terakhir selama simulasi MD 10 ns.

Ligan pada Simulasi MD	Parameter turunan dari RMSD <i>backbone</i> pada 5 ns terakhir		Parameter turunan dari RMSD <i>backbone</i> pada 1 ns terakhir	
	RMSD (Å)	Δ RMSD (Å)	RMSD (Å)	Δ RMSD (Å)
Tanpa ligan	10,996 ± 1,077	1,383 ± 1,077	12,773 ± 0,548	0,834 ± 0,548
Asam kafeat	10,713 ± 0,800	1,803 ± 0,800	11,345 ± 0,309	0,679 ± 0,309

Mengacu pada kriteria yang diusulkan Liu et al. (2017), MMP9 pada simulasi MD selama 10 ns baik dengan asam kafeat maupun tanpa ligan belum dapat dikatakan stabil. Nilai Δ RMSD pada 5 ns terakhir belum mencapai di bawah 1 Å (Tabel 1). Hal ini diduga karena *dimensional curse* akibat

struktur protein yang besar dengan 707 sekuens asam amino (Sargsyan et al., 2017; Wicaksono et al., 2020). Oleh karena itu dilakukan pula analisis pada 1 ns terakhir dari 10 ns simulasi MD. Hasil analisis nilai RMSD *backbone* pada 1 ns terakhir menunjukkan bahwa asam kafeat menstabilkan MMP9 karena dapat secara signifikan menurunkan pergeseran atom-atom yang ditandai nilai rerata RMSD lebih rendah 1,428 Å dibandingkan simulasi tanpa ligan (Tabel 1). Hasil uji statistik *t-test* independen satu arah dengan taraf kepercayaan 95% memperkuat bahwa nilai RMSD *backbone* simulasi MD 1 ns terakhir dengan asam kafeat lebih rendah daripada tanpa ligan dengan nilai $p < 0.00001$.

Hasil penelitian mengindikasikan bahwa pada level atomik salah satu mekanisme asam kafeat menjadi inhibitor MMP9 adalah berikatan pada kantung ikatan dan menstabilkan MMP9. Di lain pihak, penelitian ini juga menghasilkan luaran penting berupa kompleks MMP9-asam kafeat yang dapat digunakan untuk pengembangan protokol PVBS, terutama jika berfokus pada penemuan inhibitor MMP9 dari bahan alam. Penelitian lebih lanjut dengan MD dan sekuens yang tepat perlu dilakukan untuk pengembangan protokol penapisan virtual berbasis struktur (PVBS). Struktur-struktur *snapshot* akhir hasil simulasi MD (r2md_last.sce) yang dihasilkan dalam penelitian yang dipaparkan dalam manuskrip ini dapat diperoleh dengan mengirim e-mail ke penulis.

KESIMPULAN

Simulasi MD 10 ns mengindikasikan mekanisme aksi asam kafeat sebagai inhibitor poten MMP9 adalah dengan menduduki sisi katalitik dan menstabilisasi struktur MMP9.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian yang disajikan pada artikel ini memperoleh dana dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Sanata Dharma dengan nomor kontrak: 005/Penel./LPPM-USD/I/2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Antoni, C., Vera, L., Devel, L., Catalani, M. P., Czarny, B., Cassar-Lajeunesse, E., et al. (2013). Crystallization of bi-functional ligand protein complexes. *J. Struct. Biol.*, 182(3), 246–254.
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 103(2), 137–149.
- Hariono, M., Yuliani, S. H., Istyastono, E. P., Riswanto, F. D. O., & Adhipandito, C. F. (2018). Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in wound healing of diabetic foot ulcer: Molecular target and structure-based drug design. *Wound Medicine*, 22(September 2018), 1–13.
- Jin, U. H., Lee, J. Y., Kang, S. K., Kim, J. K., Park, W. H., Kim, J. G., et al. (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.*, 77(22), 2760–2769.
- Jones, J. I., Nguyen, T. T., Peng, Z., & Chang, M. (2019). Targeting MMP-9 in Diabetic Foot Ulcers. *Pharmaceuticals*, 12(2), 79.
- Krieger, E., Koraimann, G., & Vriend, G. (2002). Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. *Proteins*, 47(3), 393–402.
- Krieger, E., & Vriend, G. (2015). New ways to boost molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, 36(13), 996–1007.

- Król, K., Gantner, M., Tatarak, A., & Hallmann, E. (2020). The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *Eur. Food Res. Technol.*, 246(1), 33–39.
- Liu, K., Watanabe, E., & Kokubo, H. (2017). Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 31(2), 201–211.
- Naidu, M.M., Sulochanamma, G., Sampathu, S. R., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chem.*, 107(1), 377–384.
- Park, W., Kim, S., & Kim, C. (2005). A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: Isolation and structure determination. *Toxicology*, 207(3), 383–390.
- Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.*, 13(4), 1518–1524.
- Wang, T., & Ghalih, M. (2017). Evaluation of Grey Forecasting Method of Total Domestic Coffee Consumption in Indonesia. *IJBEB*, 6(4), 67–72.
- Wicaksono, R. G., Hariono, M., & Istyastono, E. P. (2020). Molecular dynamics studies of full human matrix metalloproteinase 9 liganded with N-hydroxy-2-[(4-phenylphenyl)sulfonyl-propan-2-yloxyamino]acetamide. *J. Pharm. Sci. Community*, 17(1), 1-7.
- Yusuf, S., Okuwa, M., Irwan, M., Rassa, S., Laitung, B., Thalib, A., et al. (2016). Prevalence and Risk Factor of Diabetic Foot Ulcers in a Regional Hospital, Eastern Indonesia. *Open J. Nurs.*, 6(1), 1–10.