JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS, November 2015, hlm. 48-53 Vol. 12 No. 2
ISSN: 1693-5683

UJI *IN SILICO* SENYAWA EMODIN SEBAGAI LIGAN PADA RESEPTOR ESTROGEN ALFA

Liliana[*)], Enade Perdana Istyastono
Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

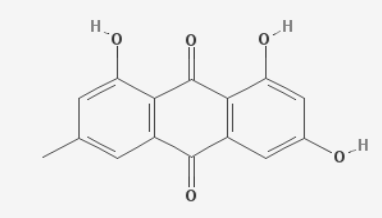
Abstract: *Breast cancer is a disease with abnormal cell proliferation at breast tissue that can invade the surrounding tissue and spread to another organ. Based on WHO (2014) at 2012, there are 48,998 breast cancer cases on women in Indonesia with 19,730 death cases. In breast cancer, overexpression estrogen receptor alpha (ER-α) usually observed. Hence ER-α became the focus of prevention and therapy for breast cancer. In vitro study of emodin shows IC_{50} 2.7 μM and Ki 0.77 μM on ER-α. In silico research using docking protocol and post docking analysis protocol shown that emodin was not an active ligand on ER-α. The outcome shown as ChemPLP score with average -75.292 and PLIF bitstring. Emodin binds with LEU346, LEU387, and ARG394 residue. Currently, the protocol that used in this research has yet identified marginal compound like emodin as an active ligand on ER-α.*

Keywords: *Breast cancer, estrogen receptor alpha, emodin, in silico, molecular docking, ChemPLP, PLIF bitstring.*

1. Pendahuluan

Kanker payudara merupakan penyakit dengan pembelahan sel abnormal pada jaringan payudara yang dapat menginvasi bagian tubuh sekitarnya dan menyebar ke organ lainnya (World Health Organization, 2013). Pada tahun 2014, terdapat 48.998 kasus kanker payudara pada wanita di Indonesia dengan kematian sebesar 19.730 kasus (21,4%) dari seluruh kasus kematian yang disebabkan oleh kanker (World Health Organization, 2014). Salah satu faktor yang berpengaruh pada kanker payudara adalah estrogen dan reseptor estrogen. Estrogen dan reseptornya berfungsi untuk memediasi efek biologi seperti genesis, perkembangan malignan dan apoptosis sel. Tingkat estrogen yang tinggi dan ekspresi reseptor estrogen alfa (RE-α) secara berlebih sering terobservasi pada sebagian besar kanker payudara (Hayashi *et al.*, 2003).

Obat terapi hormon lini utama untuk kanker payudara saat ini adalah tamoxifen. Tamoxifen bekerja sebagai antagonis reseptor estrogen dengan efek samping seperti penggumpalan darah, *stroke*, kanker rahim, dan katarak (Senkus *et al*., 2015; Suganya, Radha, Naorem, and Nishandhini, 2014). Efek samping dari obat inilah yang menyebabkan kebutuhan obat lain yang memiliki efek samping yang lebih aman (Huang *et al.*, 2013; Suganya *et al.*, 2014). Fitoestrogen alami memiliki potensi yang lebih rendah dibanding estrogen sintetis namun memiliki efek samping yang lebih sedikit dan lebih aman (Huang *et al.*, 2013).



Gambar 1. Struktur emodin (PubChem, 2015)

Emodin atau *1,3,8-trihydroxy-6-methyl-anthraquinone* (Gambar 1) merupakan salah satu contoh fitoestrogen yang terdapat dalam *Aloe vera*, *Rheum officinale*, *Polygonum cuspidatum*, dan *Rheum palmatum* (Huang *et al*., 2013; Izhaki, 2002; Yaoxian *et al*., 2013). Berdasarkan penelitian Matsuda, Shimoda, Morikawa, and Yoshikawa (2001), secara *in vitro* emodin memiliki aktivitas estrogenik terhadap RE-α dengan IC_{50} 2,7 μM dan K_i 0,77 μM. Penelitian Mysinger, Charcia, Irwin, and Shoichet (2012) secara *in silico* mendefinisikan ligan aktif adalah ligan dengan afinitas (IC_{50} atau K_i) di bawah 1 μM. Ligan dengan afinitas diantara 1 μM hingga 30 μM merupakan ligan marginal. Ligan dengan afinitas ≥ 30 μM dianggap sebagai *decoys*. Bila dilihat berdasarkan K_i maka emodin dianggap sebagai ligan aktif, namun emodin

*Email korespondensi: *angelic.lilith100@gmail.com*

dianggap sebagai ligan marginal berdasarkan IC_{50}. Penelitian ini ingin melihat emodin termasuk sebagai ligan aktif atau tidak berdasarkan protokol yang digunakan secara *in silico*.

Pengujian *in silico* memerlukan protokol yang telah tervalidasi untuk dapat mengidentifikasi senyawa sebagai ligan bagi reseptor (Setiawati dkk., 2014). Penelitian *in silico* ini mengacu pada protokol Setiawati, Riswanto, Yuliani, and Istyastono (2014) untuk penambatan molekuler. Penelitian Istyastono (2015) diacu untuk *post docking analysis* dalam penelitian ini.

Tabel I. Residu yang penting menurut *decision tree* (diadaptasi dari Istyastono, 2015)

Nomor *Bitstring*	Residu Terkait	Jenis interaksi
320	GLY420	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)
242	ARG394	Ikatan hidrogen (protein sebagai donor)
117	GLU353	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)
411	GLY521	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)
473	CYS530	Ikatan hidrogen (protein sebagai donor)
105	ASP351	Interaksi elektrostatik (protein sebagai anion)
201	LEU387	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)
470	CYS530	Interaksi non polar
170	TRP383	Aromatik *face-to-face*
171	TRP383	Aromatik *edge-to-face*
323	MET421	Interaksi non polar

2. Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah protokol PVBS Setiawati *et al.* (2012) untuk penambatan senyawa terhadap RE-α, protokol Istyastono (2015) untuk *post docking analysis*, struktur tiga dimensi emodin dalam bentuk .mol2 (didapatkan dari zinc.docking.org dengan kode: ZINC03824868), dan perangkat lunak penambatan: SPORES (Brink and Exner, 2009), PLANTS1.2 (Korb, Stutzle, and Exner, 2009), PyPLIF (Radifar, Yuniarti, and Istyastono, 2013), PyMol (Lill and Danielson, 2011), R 3.2.1 (R foundation, 2015).

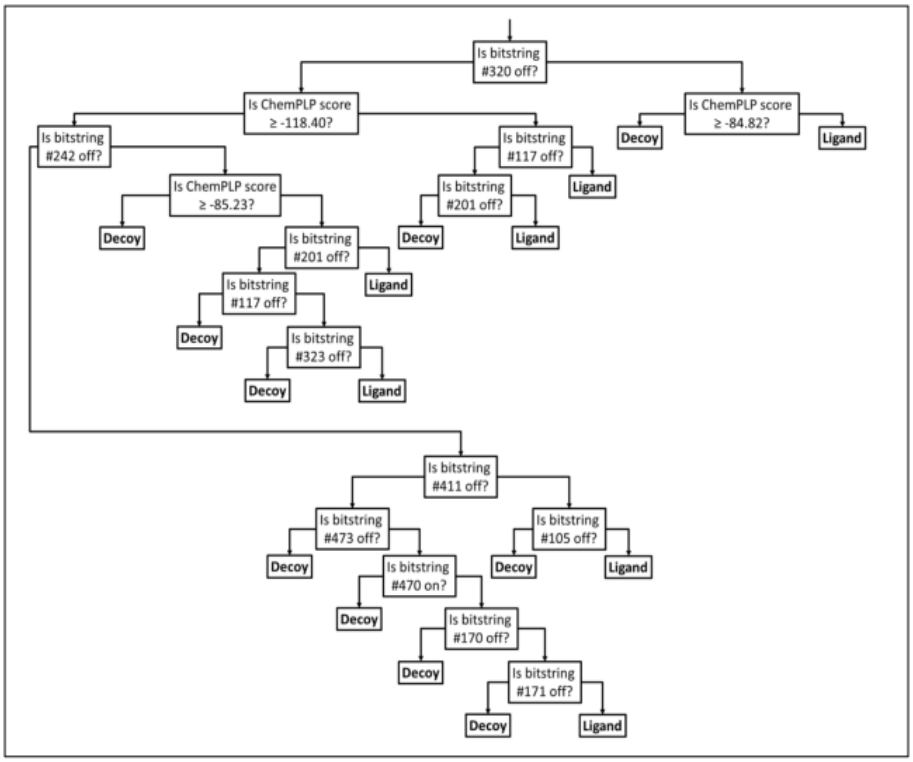
Instrumen penelitian berupa s*erver* dengan alamat *internet protocol* (IP) 103.247.10.66, dan laptop dengan spesifikasi CPU Intel$^{(R)}$ Core$^{(TM)}$ i3-3217U @1.80 GHz, RAM 4 GB dan sistem operasi Ubuntu 14.04 LTS.

2.2 Tata Cara Penelitian

2.2.1 Preparasi senyawa uji. Emodin (senyawa uji) diunduh dalam format .mol2 dan dipreparasi (modul *settypes)* dengan aplikasi SPORES.

2.2.2 Penambatan molekul. Luaran dari SPORES ditambatkan menggunakan PLANTS1.2. Setiap penambatan molekuler dilakukan tiga kali. Luaran penambatan yang diperoleh yaitu 3 x 50 pose berupa skor ChemPLP lalu diambil satu pose dengan skor terbaik (terendah). Replikasi penambatan molekul dilakukan 1000 kali, sehingga diperoleh 1000 pose terbaik masing-masing replikasi.

2.2.3 Post *docking analysis.* Data penambatan yang diperoleh berupa skor ChemPLP dan PLIF *bitstring*. Data skor ChemPLP diambil yang terbaik dari 1000 kali replikasi. Data PLIF *bitstring* menunjukkan senyawa emodin aktif sebagai ligan (ditunjukkan dengan angka 1) atau tidak aktif sebagai ligan (ditunjukkan dengan angka 0) terhadap residu (Tabel I).



Gambar 2. Decision tree dari protokol post docking analysis (Istyastono, 2015)

Data penambatan dimasukkan ke dalam *decision tree* (Gambar 2) untuk melihat bahwa protokol *post docking analysis* menganggap senyawa uji bertindak sebagai ligan atau *decoy*. Hal ini dilakukan melalui penyesuaian antara pernyataan pada *decision tree* dengan data penambatan. Bila data penambatan sesuai dengan pernyataan pada *decision tree*, maka melalui alur yang ke kiri. Bila tidak sesuai, maka melalui alur yang ke kanan. Demikian dilakukan seterusnya hingga mencapai akhir alur yang berupa pernyataan ligan atau *decoy*. Senyawa uji yang telah dianggap sebagai ligan atau *decoy*, dilihat posenya dalam kantung ikatan RE-α dengan pengamatan visual PyMol.

3. Hasil dan Pembahasan

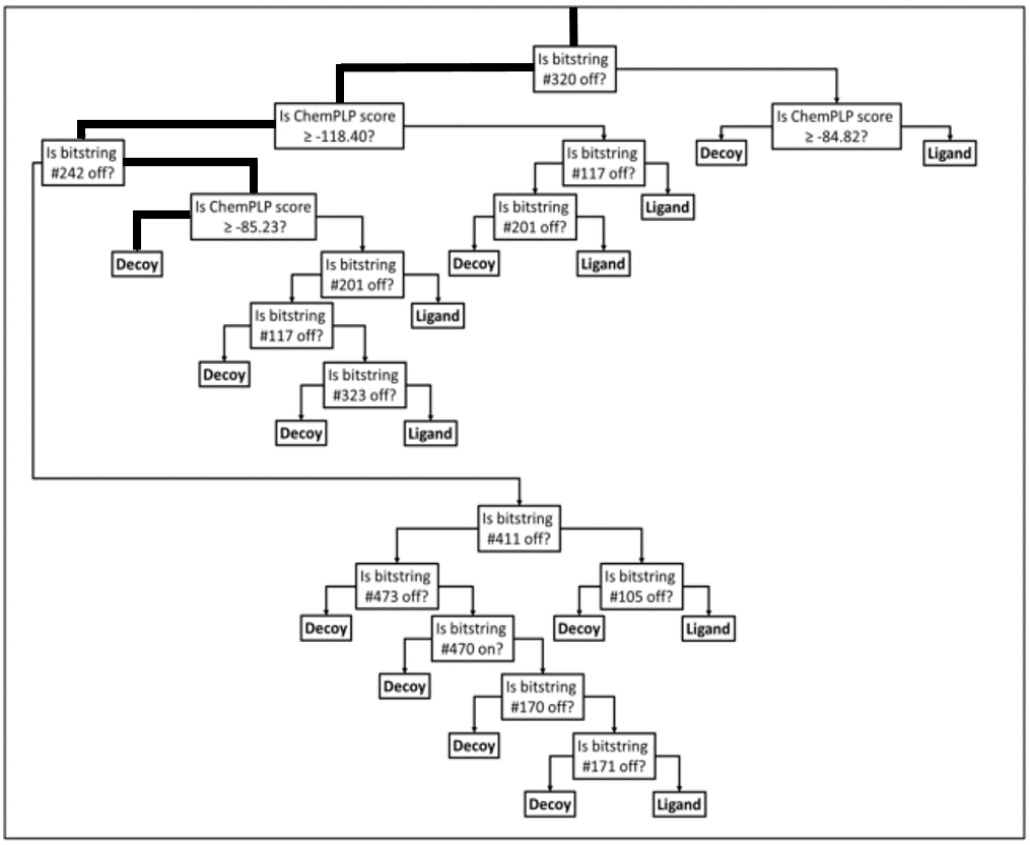
Metode *in silico* merupakan salah satu pendekatan untuk menemukan obat baru. Metode ini memerlukan protokol yang telah tervalidasi. Penelitian *in silico* senyawa emodin sebagai ligan pada RE-α menggunakan pendekatan kimia medisinal komputasi dan menggunakan dua protokol, yaitu protokol penambatan Setiawati *et al*. (2014) dan protokol *post docking analysis* Istyastono (2015). Dalam penelitian, senyawa emodin diharapkan dapat menjadi ligan aktif terhadap RE-α. Penelitian *in vitro* senyawa emodin menunjukkan aktivitas emodin terhadap RE-α (Matsuda *et al.*, 2001). Penelitian *in silico* yang dilakukan bertujuan melihat emodin bertindak sebagai ligan aktif atau ligan tidak aktif terhadap RE-α dan pose emodin dalam kantung ikatan RE-α.

Hasil penambatan didapatkan dalam bentuk ChemPLP dan PLIF *bitstring* (Tabel II). PLIF *bitstring* yang didapatkan menunjukkan ikatan senyawa uji dengan residu pada kantung ikatan RE-α (Tabel II). Dari 1000 kali replikasi, emodin memiliki skor ChemPLP -75,292 dan hanya berinteraksi dengan LEU387 sebesar 100,000% dan ARG394 sebesar 4,400%. Dari hasil penelitian dengan taraf kepercayaan 95%, dapat dikatakan emodin berikatan dengan residu LEU387 dan ARG394 di dalam kantung ikatan RE-α

Penelitian Mysinger *et al.* (2012) mendefinisikan ligan aktif adalah ligan dengan afinitas dibawah 1 µM, ligan dengan afinitas diantara 1 µM hingga 30 µM merupakan ligan marginal dan ligan dengan afinitas ≥ 30 µM merupakan *decoys*. Penelitian *in vitro* aktivitas senyawa emodin menunjukkan IC_{50} 2,7 µM dan K_i 0,77 µM pada RE-α (Matsuda, 2001). Dilihat dari

Tabel II. Luaran Penambatan Emodin Penting Dalam *Decision Tree*

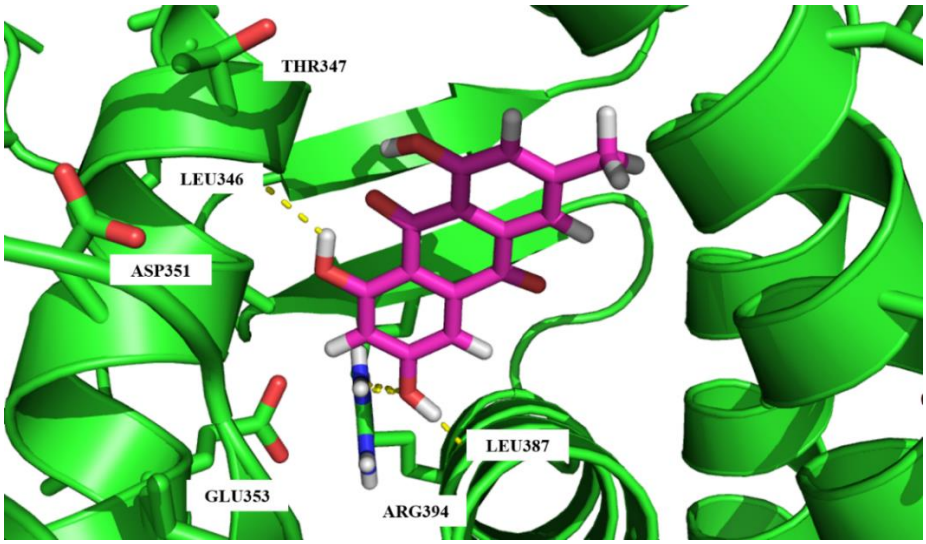
Jenis keluaran	Residu	Rata-rata replikasi emodin	Keterangan
Skor ChemPLP	-	-75,292	-
PLIF bitstring 105	ASP351	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 117	GLU353	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 170	TRP383	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 171	TRP383	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 201	LEU387	100,0%	Berikatan
PLIF bitstring 242	ARG394	4,4%	Berikatan
PLIF bitstring 323	MET421	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 411	GLY521	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 470	CYS530	0,0%	Tidak ada ikatan
PLIF bitstring 473	CYS530	0,0%	Tidak ada ikatan



Gambar 3. Alur yang dilalui emodin dalam *decision tree*

$IC_{50,}$ emodin termasuk senyawa yang merupakan ligan marginal sedangkan K_i menunjukkan emodin termasuk senyawa yang merupakan ligan aktif. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa protokol yang digunakan menganggap emodin sebagai *decoy* (Gambar 3). Untuk saat ini, protokol Setiawati *et al.* (2014) dan *post docking analysis* Istyastono (2015) belum dapat mengidentifikasi senyawa marginal sebagai ligan aktif pada RE-α.

Penelitian *in silico* senyawa emodin pada menghasilkan visualisasi ikatan emodin dengan reseptor dalam kantung ikatan RE-α (Gambar 4). Pose emodin dalam kantung ikatan RE-α menunjukkan adanya ikatan antara emodin dengan



Gambar 4. Pose emodin pada kantung ikatan RE-α

backbone, yaitu dengan LEU346 dan LEU387. Ikatan emodin dengan residu juga tampak, yaitu dengan ARG394. Ikatan yang berpengaruh penting terhadap ligan merupakan ligan aktif atau ligan tidak aktif adalah ikatan dengan LEU387 dan ARG394. Ikatan emodin dengan LEU387 berupa ikatan hidrogen dengan protein sebagai akseptor hidrogen. Dengan residu ARG394, emodin mengalami interaksi hidrogen dengan protein sebagai donor hidrogen.

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dengan protokol Setiawati *et al*. (2014) dan protokol *post docking analysis* Istyastono (2015), emodin bukan merupakan ligan aktif pada RE-α dan emodin teridentifikasi berikatan dengan residu LEU346, LEU387, dan ARG394 dalam kantung ikatan RE-α.

Daftar Pustaka

American Cancer Society, 2015. Breast Cancer. *American Cancer Society*, Amerika.

Brink, T. T., and Exner, T. E., 2009. Influence of Protonation, Tautomeric, and Stereoisomeric States on Protein-Ligand Docking Results, 49, 1535-1546.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K.S., *et al.*, 2006. Pharmacological Reviews: Estrogen Receptors, LXIV. *International Union of Pharmacology*, USA.

Ekins, S., Mestres, J., and Testa, B., 2007. *In silico* Pharmacology for Drug Discovery: Applications to Targets and Beyond. *British Journal of Pharmacology*, 152, 21.

Fullbeck, M., Huang, X., Dumdey, R., Frommel, C., Dubiel, W., and Preissner, R., 2005. Novel Curcumin- and Emodin-related Compounds Identified by *in silico* 2D/3D Conformer Screening Induce Apoptosis in Tumor Cells. *BMC Cancer*, 5, 97.

Hayashi, S. I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., *et al.*, 2003. The Expression and Function of Estrogen Receptor α and β in Human Breast Cancer and Its Clinical Application. *International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer*, 10, 193.

Huang, P.H., Huang, C.Y., Chen, M.C., Lee, Y.T., Yue, C.H., and Lin, H., 2013. Emodin and Aloe-Emodin Supress Breast Cancer Cell Proliferation through ERα Inhibition. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-2.

Izhaki, I., 2002. Emodin-A Secondary Metabolite with Multiple Ecological Functions in Higher Plants. New Phytologist, 155, p. 207.

Istyastono, E.P., 2015. Employing Recursive Partition and Regression Tree Method to Increase the Quality of Structure-Based Virtual Screening in the Estrogen Receptor Alpha Ligands Identification. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8 (6), 207-209.

Korb, O., Stutzle, T., and Exner, T. E., 2009. Empirical Scoring Function for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49 (1), pp. 84-96.

Li, F., Li, X., Shao, J., Chi, P., Chen, J., and Wang, Z., 2010. Estrogenic Activity of Anthraquinone Derivative In Vitro and *In Silico* Studies. *Chem. Res. Toxicol*., 23 (8), 1349-1351.

Lill, M. A., and Danielson, M. L., 2011. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *J Comput Aided Mol*, 25, 13-19.

Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T., and Yoshikawa, M., 2001. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11, 1839.

Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J., and Shoichet, B. K., 2012. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, p. 6591.

PubChem, 2015. Emodin, *NIH*, http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/emodin, diakses tanggal 10 Mei 2015.

R foundation, 2015. R 3.2.1 is released, *R foundation*, www.r-statistics.com, diakses tanggal 24 November 2015.

Radifar, M., Yuniarti, N., and Istyastono, E. P., 2013. PyPLIF: Python-based Protein-Ligand Interaction Fingerprinting. *Bioinformation*, 9 (6), pp. 325-328.

Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., *et al*, 2015. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines, ESMO, http://www.esmo.org/Guidelines/Breast-Cancer/Primary-Breast-Cancer, diakses tanggal 7 November 2015.

Setiawati, A., Riswanto, F.D.O., Yuliani, S.H., and Istyastono, E.P., 2014. Retrospective Validation of Structure-Based Virtual Screening Protocol to Identify Ligands for Estrogen Receptor Alpha and Its Application to Identify the Alpha-Mangostin Binding Pose. *Indo. J. Chem*, 14 (2), 103-108.

Setiawati, A., Soesanto, A.M., Nata, C.D., Chandra, R.K., dan Riswanto, F.D.O., Yuliani, S.H., dkk., 2014. Simulasi Penambatan Molekuler Coumestrol, Daidzein, dan Genistein pada Reseptor Estrogen Alfa. *Jurnal Penelitian*, 17 (2), 91-94.

Suganya, J., Radha, M., Naorem, D.L., and Nishandhini, M., 2014. *In Silico* Docking Studies of Selected Flavonoids-Natural Healing Agents Against Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (19), 8155-8159.

World Health Organisation, 2013. Breast Cancer: Prevention and Control, *World Health Organisation*, http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html, diakses tanggal 14 April 2015.

World Health Organisation, 2014. Indonesia, *World Health Organisation*, http://www.who.int/cancer/country-profiles/idn_en.pdf?ua=1, diakses tanggal 14 April 2015.

World Health Organisation, 2015. Cancer, *World Health Organisation*, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/, diakses tanggal 10 Mei 2015.

Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G., and Xiaoke, W., 2013. Emodin Induces Apoptosis of Human Cervical Cancer Hela Cells via Intrinsic Mitochondrial and Extrinsic Death Receptor Pathway. *Cancer Cell International*, 13, 71.