SIMULASI PENAMBATAN MOLEKULER COUMESTROL, DAIDZEIN, DAN GENISTEIN PADA RESEPTOR ESTROGEN ALFA

Agustina Setiawati, Astuti Malyawati Soesanto, Chandra Dewa Nata, Ricardo Kenny Chandra, Florentinus Dika Octa Riswanto, Sri Hartati Yuliani, dan **Enade Perdana Istyastono**

Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma
Alamat korespondensi: Kampus III Paingan Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta
Email: *nina@usd.ac.id*

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer worldwide and covers 16% of total cancer incidence on woman. Two out of three breast cancer prevalence are caused by estrogen receptor alpha (ERα) overexpression. Coumestrol, daidzein, and genistein are known for their ability to interact with some proteins, one of which is ERα.

Screening coumestrol, daidzein, and genistein as ligands for ERα were mainly completed using PLANTS1.2 and Python-based protein-ligand interaction fingerprinting *(PyPLIF) software and protocol developed by Radifar* et al. *(2013). Tc-PLIF value were then statistically analized to verify whether ligands are active to ERα. According to protocol developed by Radifar* et al. *(2013), the result shown that statistically coumestrol, daidzein, and genistein were not ligand for ERα.*

Key words : *coumestrol, daidzein, genistein, estrogen receptor alpha, molecular docking, PyPLIF*

1. PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan sekelompok sel abnormal yang disebabkan oleh proses pembelahan sel yang berlebihan dan tidak terkoordinasi yang terjadi pada payudara (Kumar, 2007). Menurut WHO, kanker payudara adalah jenis kanker yang paling umum diderita oleh wanita dan berdasarkan data statistiknya, 508.000 orang wanita dari seluruh wanita di dunia meninggal karena kanker payudara pada tahun 2011 (WHO, 2013). Di Indonesia, kanker payudara diperkirakan mengakibatkan kematian terhadap 12.352 orang pada tahun 2005 (Ramli, 2003).

Peran REα terhadap kanker payudara yaitu peningkatan pengikatan estrogen pada REα dapat menstimulasi proliferasi dari sel payudara sehingga menyebabkan peningkatan pembelahan sel dan replikasi DNA yang memicu mutasi. Hal tersebut dapat mengganggu daur sel, apoptosis, dan perbaikan DNA sehingga terbentuk tumor (Deroo dan Korach, 2006). Melihat peran REα maka diperlukan anti kanker yang dapat berikatan dengan REα.

Studi *in silico* memberikan keuntungan dalam penemuan obat baru secara efisien dengan menggunakan metode pemodelan yakni simulasi dengan bantuan teknologi komputasi (Pelkonen dkk., 2011). Studi *in silico* membutuhkan protokol yang tervalidasi agar dapat mengidentifikasi senyawa-senyawa yang dapat menjadi ligan bagi reseptor. Protokol penapisan REα sudah banyak dikembangkan, salah satunya adalah protokol yang dikembangkan oleh Radifar dkk. (2013).

Berdasarkan penelitian Hopert dkk. (1998), coumestrol, daidzein, genistein secara *in vitro* dan *in vivo* dapat berikatan dengan REα. Namun perlu diketahui apakah secara *in silico* coumestrol, daidzein, dan genistein dapat menjadi ligan REα menurut Radifar dkk. (2013). Hasil penelitian ini juga digunakan sebagai validasi retroprospektif protokol Radifar dkk. (2013). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menguji apakah protokol penapisan in silico yang dikembangkan Radifar dkk. (2013) mampu mengenali coumestrol, daidzein, dan genistein sebagai ligan pada REα.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Bahan visualisasi yang digunakan didapatkan dari *Protein Data Bank* (PDB) dan *ZINC Database* berupa struktur 3 dimensi (3D) protein target dan senyawa-senyawa uji dalam hal ini coumestrol, daidzein, dan genistein (Irwin dan Schoichet, 2005; Irwin dkk., 2012). Berkas konfigurasi untuk simulasi penambatan molekul didapatkan dari hasil penelitian Anita dkk. (2012) dan konfigurasi untuk PyPLIF didapatkan dari hasil penelitian Radifar dkk. (2013). Penelitian ini menggunakan server Laboratorium Virtual Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma (pharcomp.usd) HP Proliant ML110-67 dengan spesifikasi: CPU intel Xeon® E31220 @3.10 GHz, RAM 8GB, dengan sistem operasi Ubuntu 12.04, versi kernel 3.5.0-23-*genetic* serta menggunakan aplikasi-aplikasi berikut: Open Babel 2.2.3 (O'Boyle dkk., 2011), SPORES (Ten Brink dan Exner, 2009), PLANTS 1.2 (Korb dkk., 2009), PyPLIF (Radifar dkk., 2013), dan R 2.14.0 (R Development Core Team, 2008).

2.2 Tata Cara Penelitian

Protokol yang telah dikembangkan oleh Anita dkk. (2012) dan telah divalidasi kembali oleh Radifar dkk. (2013) digunakan untuk menambatkan ligan coumestrol, daidzein, dan genistein sebanyak 1.000 kali dengan 3 kali replikasi pada REα. Protokol menggunakan PLANTS 1.2 (Korb dkk., 2009) untuk melakukan penambatan molekuler dan PyPLIF (Radifar dkk., 2013) untuk melakukan penilaian ulang dari hasil penambatan molekuler. Setiap replikasi, dilakukan perhitungan Tc-PLIF kemudian dilakukan penyaringan pose yang memiliki ikatan dengan Asp351 (Radifar dkk., 2013) dan dipilih pose dengan nilai Tc-PLIF terbaik setiap replikasi. Data Tc-PLIF dianalisis dengan aplikasi R komputasi statisik menggunakan *Wilcoxon-test* untuk melihat apakah nilai Tc-PLIF di atas 0.600 (Marcou and Rognan, 2007).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu tujuan pengembangan metode *in silico* adalah sebagai pendekatan untuk menemukan obat baru, namun untuk melakukan pendekatan secara *in silico* dibutuhkan protokol yang telah tervalidasi. Ligan yang akan ditambatkan pada REα adalah coumestrol, daidzein, dan genistein (senyawa fitoestrogen) yang telah diketahui aktif sebagai antagonis REα secara *in vitro* maupun *in vivo*. Sehingga penelitian ini dapat digunakan untuk validasi prospektif protokol Radifar dkk. (2013).

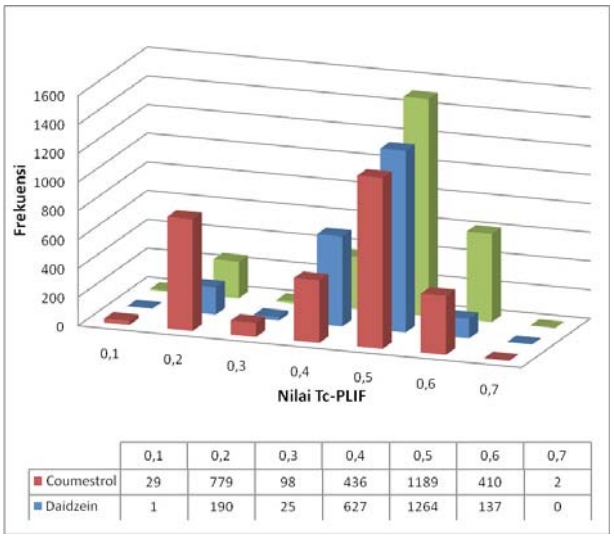
Coumestrol, daidzein, dan genistein yang merupakan ligan ditambatkan pada REα dengan menggunakan perangkat lunak PLANTS1.2. Luaran yang dihasilkan berupa pose ikatan antara ligan dengan REα dan skor ChemPLP. Hasil penambatan kemudian dilanjutkan dengan identifikasi IFP dengan menggunakan perangkat lunak PyPLIF serta dilakukan filtrasi pada pose ligan yang mempunyai ikatan hidrogen dengan Asp351 (Radifar dkk., 2013), sehingga hanya diterima pose yang memiliki ikatan hidrogen dengan Asp351.

Efektivitas ligan pada REα ditentukan berdasarkan nilai Tc-PLIF yang merupakan nilai dari kemiripan IFP antara ligan dengan standar. Standar yang digunakan pada protokol ini adalah 4-hidroksitamoksifen (OHT), metabolit aktif dari tamoksifen yang memiliki afinitas 100 kali lipat lebih besar dari estradiol untuk berikatan dengan REα (Berry, 2008). Ligan dapat dikatakan sebagai ligan yang aktif pada REα Jika ligan mempunyai IFP yang mirip dengan OHT. Syarat ligan dapat dikatakan aktif apabila memiliki nilai Tc-PLIF lebih besar sama dengan 0,600 (Marcou dan Rognan, 2007).

Dari hasil penambatan yang dilakukan, didapatkan nilai Tc-PLIF rata-rata coumestrol, daidzein, dan genistein berturut-turut sebesar 0,356 (SEM=0,003); 0,376 (SEM=0,0025); dan 0,425 (SEM=0,0027) dengan nilai median sebesar 0,417; 0,375; dan 0,458. Sebaran nilai Tc-PLIF ditampilkan dalam bentuk histogram (Gambar 1). Uji *Shapiro-wilk* menunjukkan bahwa nilai Tc-PLIF yang didapatkan tidak terdistribusi normal, dan uji variansi menunjukkan variansi yang tidak homogen, sehingga dilakukan uji *Wilcoxon* untuk mengetahui apakah nilai Tc-PLIF ligan lebih kecil dari 0,600.

Secara statistik dengan taraf kepercayaan 95% nilai Tc-PLIF coumestrol, daidzein, dan genistein lebih kecil dari 0,600. Hal ini menandakan bahwa coumestrol, daidzein, dan genistein bukan merupakan ligan bagi REα secara *in silico* menurut protokol yang dikembangkan oleh Radifar dkk. (2013).

Coumestrol, daidzein, dan genistein secara *in vitro* merupakan ligan aktif bagi REα, namun tidak dapat dikenali sebagai ligan aktif menurut protokol *in silico* Radifar dkk. (2013), hal ini dapat disebabkan



	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Coumestrol	29	779	98	436	1189	410	2
Daidzein	1	190	25	627	1264	137	0

Gambar 1: Histogram Sebaran Nilai Tc-PLIF Coumestrol, Daidzein, dan Genistein

karena protokol Radifar dkk. (2013) menggunakan metode IFP. kelemahan dari metode IFP yaitu metode tersebut sangat bergantung pada senyawa standar karena IFP mengukur kemiripan sidik jari interaksi ligan dengan sidik jari interaksi senyawa standar. Dalam protokol Radifar dkk. (2013) senyawa standar yang digunakan adalah OHT yang memiliki afinitas 100 kali lebih besar dari estradiol untuk berikatan dengan REá (Berry, 2008) sedangkan coumestrol, dadizein, dan genistein mempunyai afinitas kurang lebih 100 kali lebih lemah dari estradiol untuk berikatan dengan REá (Hopert dkk., 1998), sehingga OHT akan memberikan sidik jari interaksi yang jauh lebih besar dibandingkan sidik jari interaksi ligan. Oleh karena itu, perlu pengembangan protokol dapat dilakukan dengan memilih senyawa standar baru yang memiliki aktivitas dalam menghambat REα namun tidak bersifat terlalu poten, sehingga senyawa alam yang terbukti aktif dapat dikenali oleh protokol sebagai ligan yang aktif. Pertimbangan pengembangan lainnya yaitu dapat dilakukan dengan mengganti penyaringan asam amino Asp351 dengan asam amino lain yang berperan dalam pengikatan ligan bagi REá seperti Glu353, Arg394, Thr347.

4. KESIMPULAN

Coumestrol, daidzein, dan genistein bukan merupakan ligan bagi REα menurut protokol penapisan *in silico* yang dikembangkan Radifar dkk. (2013).

DAFTAR PUSTAKA

Anita, Y., Radifar, M., Kardono, L.B.S., Hanafi, M., dan Istyastono, E.P. 2012. "Structure-based design of Eugenol Analogs as Potential Estrogen Receptor Antagonists", *Bioinformation*, 8 (19): 901-906.

Berry, N. B. 2008. "Regulation of Estrogen Receptor-Alpha Ubiquitination and Proteasome-mediated Receptor Degradation". *Dissertation,* 4. Indiana University, India.

Deroo, B.J., dan Korach, K.S. 2006. "Estrogen Receptors and Human Disease". *Journal of Clinical Investigation,* 116 (3): 561-567.

Hopert A.C., Beyer A., Frank K., Strunck E., Wiinsche W., dan Volimer G. 1998. "Characterization of Estrogenicity of Phytoestrogens in an Endometrial-derived Experimental Model". *Environmental Health Perspectives,* 106 (9): 581-586.

Irwin, J.J., dan Schoichet, B.K. 2005. "ZINC-A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening". *J. Chem. Inf. Model.* 45: 177-182.

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

Kumar, V. 2007. *Buku Ajar Patologi.* Ed. 7, Jakarta: EGC, P. 186-187.

Marcou, G., dan Rognan, D. 2007. "Optimizing Fragment and Scaffold Docking by use of Molecular Interaction Fingerprints". *Journal of Chemical Information and Modeling,* 47 (1): 195–207.

O'Boyle N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., dan Hutchison, G.R. 2011. "Open Babel: An Open Chemical Toolbox". *J. Cheminform,* 3, 33.

Pelkonen, O., Turpeinen, M., dan Raunio, H. 2011. "In Vivo In Vitro In Silico Pharmacokinetic Modelling in Drug Development", *Clinical Pharmakokinetics,* 50 (8): 483-491.

R Development Core Team. 2008. R:A Language and Environment for Statistical Computing, R foundation for Statistical Computing, Vienna.

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

Ramli, M. 2003. "Management of Breast Cancer". *Kumpulan Naskah Ilmiah Muktamar VI PERABOI*. Semarang, pp.15-37.

Ten Brink T. dan Exner, T. E. 2009. "Influence of Protonation, Tautomeric, and Stereoisomeric States on Protein-ligand Docking results". *J. Chem. Inf. Model.,* 49, 1535-46.

WHO. 2013. *Breast Cancer: prevention and control. http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html.* Diakses pada Tanggal 23 Desember 2013.