



Uji *Molecular Docking* *Annomuricin E* dan *Muricapentocin* pada Aktivitas Antiproliferasi

(Molecular Docking Studies of *Annomuricin E* and *Muricapentocin* on Antiproliferation Activity)

ROSA ADELINA*

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI
Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560.

Diterima 11 Januari 2013, Disetujui 5 Oktober 2013

Abstrak: Berbagai senyawa alam telah dilaporkan dapat digunakan sebagai antikanker namun demikian mekanisme aksinya belum dapat ditentukan secara jelas. Salah satu senyawa dalam tanaman adalah *acetogenin* yang dapat menginduksi apoptosis dalam studi *in vitro*. Dua *acetogenin* terbaru yang ditemukan dalam *Annona muricata* adalah *annomuricin E* dan *muricapentocin*. *Molecular docking* merupakan salah satu model *in silico* untuk skrining senyawa berdasarkan mekanismenya terhadap protein. Oleh karena itu, kedua senyawa ini *didocking* menggunakan PLANTS 1.1 untuk melihat afinitasnya dengan protein proliferasi, yaitu Protein Kinase C. Perhitungan RMSD terhadap letak ikatan prediksi terbaik memberikan nilai sebesar 1,3906 Å. Hasil *molecular docking* dari senyawa referensi (07u), *annomuricin E* dan *muricapentocin* menunjukkan skor kestabilan interaksi masing-masing sebesar -71,161; -127,739; dan -116,868. Hal ini menunjukkan *annomuricin E* memiliki afinitas terbaik terhadap Protein Kinase C dan dapat menghambat proliferasi lebih baik dibandingkan senyawa referensi dan *muricapentocin*.

Kata kunci: *molecular docking*, *annomuricin E*, *muricapentocin*, PKC.

Abstract: Various natural compounds have been reported to be used as anticancer, however their modes of action have not been clearly defined. One of the plant compounds is acetogenin which can induce apoptosis in *in vitro* study. Two new acetogenins discovered in *Annona muricata* are *annomuricin E* and *muricapentocin*. *Molecular docking* is one of *in silico* model to screen compounds based on their mechanism to protein. Therefore, the two compounds were docked using PLANTS 1.1 to see the affinity to proliferation protein, Protein Kinase C. The RMSD calculations of the best predicting binding site gave 1.3906 Å. The molecular docking results of native ligand (07u), *annomuricin E*, and *muricapentocin* are -71.161; -127.739; and -116.868. It showed that *annomuricin E* has the best *in silico* affinity to Protein Kinase C, and has better ability to inhibit proliferation as compared to the native ligand and *muricapentocin*.

Keywords: molecular docking, *annomuricin E*, *muricapentocin*, PKC.

PENDAHULUAN

KEMATIAN akibat kanker menunjukkan insiden yang tinggi di dunia dan semakin meningkat setiap tahunnya. Menurut WHO jumlah penderita kanker setiap tahun bertambah sekitar tujuh juta orang di dunia, dan dua per tiga diantaranya berada di

negara-negara yang sedang berkembang. Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26.000.000 orang akan menderita kanker dan 17.000.000 meninggal karena kanker pada tahun 2030. Ironisnya, menurut *Union for International Cancer Control* pada tahun 2009, kejadian ini akan terjadi lebih cepat di negara miskin dan berkembang⁽¹⁾. Di Amerika Serikat, lebih dari 12.000 jumlah kematian per tahun terkait dengan kanker hati⁽²⁾. Insiden kanker payudara di negara berkembang semakin meningkat dari tahun ke

* Penulis korespondensi, Hp. 081802680963
e-mail: rosa.adelina@litbang.depkes.go.id



tahun^(3,4). Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia dengan persentase 16,85%⁽¹⁾. Untuk itu diperlukan pengobatan kanker secara dini karena kanker umumnya berakhir dengan kematian. Pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif untuk penyakit kanker sangat penting untuk diteliti⁽⁵⁾.

Pengetahuan berbasis molekuler untuk karsinogenesis telah terbukti untuk menemukan agen kemopreventif yang baru, lebih selektif dengan toksisitas yang rendah. Saat ini penelitian telah difokuskan untuk identifikasi senyawa alam yang mampu menghambat karsinogenesis⁽⁶⁾. Daun sirsak mengandung senyawa golongan *acetogenin*, minyak esensial, *reticuline*, *loreximine*, *coclaurine*, *annomurine*, dan *higenamine*. Golongan senyawa *acetogenin* adalah komponen fitokimia dalam daun sirsak yang memiliki potensi sebagai antikanker^(7,8) dan daun sirsak mengandung hingga 17 senyawa *acetogenin* yang berperan sebagai sitotoksik⁽⁹⁾. *Bullatacin* yang juga termasuk golongan *acetogenin* terbukti dapat menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram) pada hepatoma⁽¹⁰⁾.

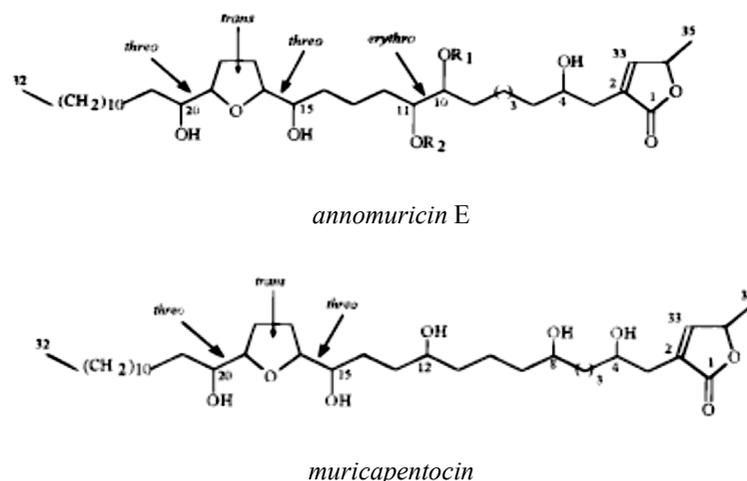
Di dalam proses pengembangan obat, prediksi struktur kompleks senyawa-protein yang dinamakan *docking* ligan-protein biasanya digunakan secara ekstensif pada *database* yang besar dan optimisasi yang baik. Struktur protein, struktur ligan dan fungsi *scoring* yang diberikan bertujuan untuk menemukan konformasi ligan yang memiliki energi rendah pada sisi ikatan protein yang berhubungan dengan fungsi *scoring* minimum secara umum. Algoritma *docking* PLANTS berdasarkan kelas algoritma optimisasi stokastik yang dinamakan *Ant Colony Optimization* (ACO). ACO diinisiasi berdasarkan perilaku semut

yang menemukan jalan terpendek antara sarang dan sumber makanan. Semut menggunakan komunikasi tidak langsung yaitu dalam bentuk feromon yang menandai jalan antara sarang dan sumber makanan. Pada kasus *docking* senyawa-protein, “koloni semut” diperintahkan untuk menemukan konformasi senyawa yang memberikan energi terendah pada sisi ikatan protein (PLANTS)⁽¹¹⁾.

Pada penelitian ini, senyawa alam *acetogenin* yang berasal dari daun Sirsak (*Annona muricata* L.) diuji dengan metode komputasi menggunakan *software* PLANTS 1.1. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji kemungkinan mekanisme lain dari ekstrak daun sirsak sebagai agen antikanker, yaitu antiproliferasi. Makromolekul target dari simulasi *docking* adalah protein proliferasi, yaitu Protein Kinase C (PKC). PKC yang merupakan kelompok serin/treonin kinase memainkan peranan penting dalam karsinogenesis dan merupakan target pada terapi kanker⁽¹²⁾. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat diketahui kemampuan antiproliferasi dari dua senyawa *acetogenin* terhadap PKC.

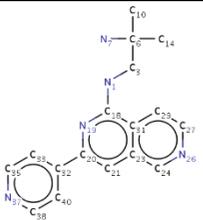
BAHAN DAN METODE

Uji komputasi dilakukan dengan tiga tahap. Tahap pertama adalah preparasi PKC. Preparasi protein dilakukan menggunakan *software* YASARA (YASARA Biosciences, Austria). Pada tahap ini dilakukan eliminasi molekul air dan ligan referens serta penambahan atom hidrogen. Tahap kedua adalah penyiapan ligan. Penyiapan ligan dilakukan menggunakan Marvin Sketch (Chemaxon, Belanda). Ligan dibangun secara manual, dan dikondisikan pada pH 7,4 kemudian diminimalisasi energinya untuk mencari 1 konformasi senyawa terbaik. Tahap ketiga adalah *molecular*



Gambar 1. Struktur senyawa *acetogenin* yang digunakan pada uji *molecular docking*.

**Tabel 1. Makromolekul target, kode PDB, nama senyawa, dan struktur ligan yang digunakan pada uji *molecular docking*.**

Makromolekul Target	Kode PDB	Senyawa	Struktur ligan referens
PKC	3TXO	07u	

docking. *Docking* dilakukan dengan menggunakan *software* PLANTS 1.1 (Universität Konstanz, Jerman). Proses *docking* dilakukan antara protein PKC dengan *annonuricin E* dan *muricapentocin* yang dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1. Tahap keempat dilakukan dengan melihat jarak ikatan dan bentuk interaksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji komputasi dilakukan untuk memprediksi kemungkinan mekanisme molekuler yang terjadi antara ligan dengan PKC, sehingga dapat berperan sebagai agen antikanker. Salah satu mekanisme molekuler antikanker adalah dengan menghambat aktivasi PKC yang berperan dalam proliferasi sel kanker. Tahap yang dilakukan untuk penelitian ini adalah preparasi ligan dan PKC, perhitungan *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *docking*, dan visualisasi hasil *docking*.

Pada tahap preparasi struktur ligan dilakukan minimalisasi energi dan penetapan lima konformasi ligan yang memiliki energi konformasi terendah (Tabel 2). Hasil minimalisasi energi menunjukkan bahwa ligan referens dengan kode 07u memiliki konformasi yang lebih stabil dibandingkan *annonuricin E*

Tabel 2. Konformasi paling stabil hasil minimalisasi energi.

Ligan	Konformasi ligan ke-	Energi (kkal/mol)
07u	1	60,88
	2	60,98
	3	61,09
	4	62,11
	5	62,21
<i>annonuricin E</i>	1	93,73
	2	93,94
	3	94,02
	4	94,90
	5	95,47
<i>muricapentocin</i>	1	93,04
	2	93,84
	3	94,04
	4	94,97
	5	95,24

dan *muricapentocin*. Hasil minimalisasi energi menggunakan aplikasi Marvin Sketch memberikan konformasi yang berbeda dengan jumlah yang diinginkan oleh peneliti. Konformasi ini memberikan posisi titik awal *docking* yang berbeda tergantung konformasinya. Titik awal ini memberikan hasil yang berbeda berdasarkan algoritma stokastik yang digunakan dalam PLANTS. Oleh karenanya, berdasarkan nilai stokastik dari PLANTS_{CHEMPLP} (skor fungsi yang digunakan di *software* PLANTS) dan untuk menghindari nilai bias, digunakan ligan dengan lima konformasi untuk proses *docking*⁽¹³⁾.

Tahap kedua adalah validasi metode *molecular docking* dengan menghitung nilai RMSD. Penggunaan *software* PLANTS baru digunakan selama dua tahun oleh praktisi kimia komputasi di Indonesia. Walaupun termasuk *software* baru, namun PLANTS mampu memberikan kesuksesan hasil yang lebih bagus dalam waktu yang lebih singkat⁽¹³⁾. Metode yang digunakan oleh peneliti telah tervalidasi oleh nilai RMSD yang kurang dari dua sehingga metode ini dapat digunakan untuk proses *docking*⁽¹⁴⁾. Nilai RMSD < 2 Å menunjukkan struktur yang memiliki energi paling rendah yang sangat mirip dengan struktur hasil *docking*⁽¹³⁾. Hal ini menunjukkan aplikasi *software* yang digunakan (Marvin Sketch, YASARA, dan PLANTS 1.1) memiliki kapabilitas prediksi yang valid dalam kondisi ideal, tanpa terganggu variabel lain untuk target virtual PKC dengan kode pdb 3TXO.

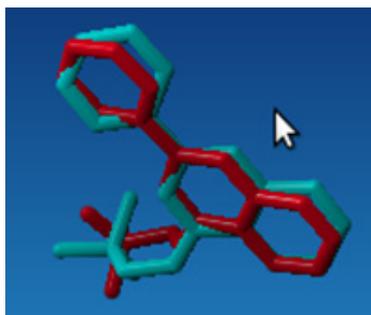
Konformasi ligan referens dengan kode 07u yang memberikan nilai PLANTS_{CHEMPLP} terbaik adalah konformasi 1 (Tabel 3). Nilai RMSD yang dihasilkan pada perhitungan ini sebesar 1,3906 Å yang berarti konformasi struktur ligan referens dari PDB dengan ligan referens hasil *docking* mirip dan terpilih dengan baik seperti yang terlihat pada Gambar 2. Ligan referens dari PDB berwarna biru kehijauan dan ligan

Tabel 3. Skor hasil *docking*.

Ligan	Konformasi ligan ke	Skor PLANTS _{CHEMPLP}
07u	1	-71.161*
	2	-70.5885
	3	-70.9227
	4	-70.6201
	5	-70.5488
<i>annonuricin E</i>	1	-122.258
	2	-113.849
	3	-127.739*
	4	-124.471
	5	-121.046
<i>muricapentocin</i>	1	-116.868*
	2	-110.664
	3	-111.919
	4	-111.044
	5	-103.165

Keterangan: *skor PLANTS_{CHEMPLP} terendah.





Gambar 2. Gambaran hasil RMSD.

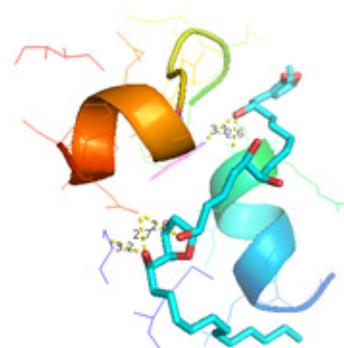
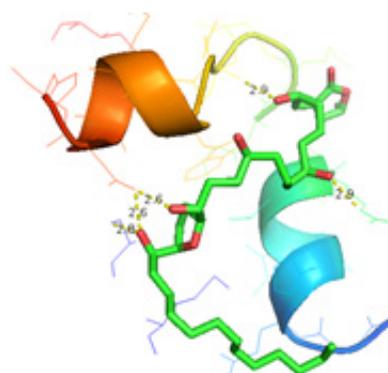


Gambar 3. Interaksi 07u-PKC.

referens hasil *docking* berwarna merah.

Tahap ketiga dilakukan *molecular docking* terhadap senyawa *annomuricin E* dan *muricapentocin*. *Molecular docking* dilakukan untuk memprediksi kemampuan ligan untuk berikatan dengan PKC dan memprediksi kekuatan ikatan yang terjadi antara ligan dan PKC. Penghambatan molekul PKC oleh senyawa *acetogenin* akan menghasilkan respon biologis berupa efek penghambatan proliferasi (antiproliferasi) yang dapat diprediksi melalui skor yang didapatkan dari hasil *docking*. Skor merupakan parameter kekuatan afinitas pengikatan ligan uji terhadap reseptor. Semakin stabil interaksi ligan-protein dicerminkan dengan semakin rendahnya skor (minus). Kestabilan interaksi ini sebanding dengan potensi senyawa dalam memberikan efek yang sama dengan ligan referens (antiproliferasi) secara virtual.

Hasil *molecular docking* pada ketiga ligan (07u, *annomuricin E*, dan *muricapentocin*) menunjukkan bahwa ligan *annomuricin E* memiliki skor $PLANTS_{CHEMPLP}$ paling rendah (Tabel 3), sehingga menunjukkan ikatan *annomuricin E* dan PKC paling stabil, serta *annomuricin E* memiliki kemampuan penghambatan PKC yang paling baik. Adapun 5 ikatan hidrogen yang terbentuk pada ikatan *annomuricin E* - PKC melibatkan 3 atom pada ligan yang memberikan

Gambar 4. Interaksi *annomuricin E*- PKC.Gambar 5. Interaksi *muricapentocin*-PKC.

Tabel 4. Interaksi senyawa dengan PKC.

Senyawa	Jenis ikatan	Residu yang berperan pada reseptor	Atom yang berperan pada ligan	Jarak Ikatan (Å)	Peran ligan
07u	Hidrogen	Fenilalanin 612	N pada gugus 7-amina	3,0	donor hidrogen
		Histidin 606	N pada gugus 26-naftiridin	2,7	akseptor hidrogen
		Leusin 609	N pada gugus 3-amina	2,9	donor hidrogen
		Leusin 609	N pada gugus 7-amina	2,7	donor hidrogen
<i>annomuricin E</i>	Hidrogen	Serin 465	O dari 13-hidroksi	3,2	donor hidrogen
		Asparagin 623	O dari 13-hidroksi	2,7	donor hidrogen
		Asparagin 623	O dari 18-hidroksi	2,8	donor hidrogen
		Triptofan 619	O dari 29-hidroksi	3,1	akseptor hidrogen
		Leusin 609	O dari 29-hidroksi	2,6	donor hidrogen
<i>muricapentocin</i>	Hidrogen	Serin 465	O dari 13-hidroksi	2,8	donor hidrogen
		Asparagin 622	O dari 13-hidroksi	2,6	donor hidrogen
		Asparagin 622	O dari 18-hidroksi	2,6	donor hidrogen
		Arginin 610	O dari 25-hidroksi	2,9	akseptor hidrogen
		Leusin 617	O dari 28-hidroksi	2,9	donor hidrogen

kontribusi pada kestabilan ikatan tersebut. Sedangkan ligan referens dengan kode 07u melibatkan 3 atom yang mampu menghasilkan 4 ikatan hidrogen dan *muricapentocin* melibatkan 4 atom yang mampu menghasilkan 5 ikatan hidrogen (Tabel 4 dan Gambar 3, 4 dan 5).

Tabel 3 menunjukkan bahwa *annomuricin E* memberikan skor *docking* yang paling rendah. Hal ini menunjukkan interaksi *annomuricin E* dan PKC memberikan afinitas ikatan paling baik walaupun melibatkan jumlah atom yang lebih sedikit dibandingkan kedua ligan lainnya. Selain itu, jumlah atom yang berperan dalam suatu ikatan dan energi konformasi ligan tidak berdampak terhadap kekuatan ikatan. Kemungkinan yang berperan dalam kekuatan ikatan adalah konformasi ligan. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa kedua senyawa *acetogenin* yang terkandung dalam daun sirsak berpotensi sebagai agen antiproliferasi yang dapat berperan sebagai antikanker. PKC yang merupakan salah satu dari regulator dalam siklus sel merupakan titik penting dalam proses proliferasi sel kanker melalui jalur NF κ B. Dengan demikian penghambatan aktivasi protein ini akan menghambat proliferasi sel kanker sehingga potensial sebagai agen antikanker.

SIMPULAN

Annomuricin E dan *muricapentocin* berpotensi sebagai inhibitor PKC sehingga mampu menghambat proliferasi dan berperan sebagai antikanker secara *in silico*. Hasil *docking* menunjukkan *annomuricin E* merupakan inhibitor PKC terbaik dibandingkan *muricapentocin* dan ligan referens 07u.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan yang telah membiayai penelitian ini, Drs. Hari Purnomo, M.S., Apt., dan Muhammad Radifar, S. Farm atas diskusi terkait *molecular docking*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yayasan Kanker Indonesia. YKI-Jakarta *race* [serial online]. 2012. diambil dari URL: <http://yayaskankerindonesia.org/2012/yki-jakarta-race/>. diakses 29 November, 2012.
2. Thuluvath PJ, Choti M, Geschwind JF, Norwitz L, and Kalloo AN. Liver cancer [serial online]. 2006. diambil dari URL: <http://gastro.nts.jhu.edu>. diakses 12 Februari, 2012.
3. Singletary K, McDonald C, Tovinelli M, Fisher C, Wallig M. Effect of the diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoilmethane on rat mammary DNA adduct and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 1998. 9(6):1039-43.
4. Yaar, Mina, Eller, Mark S, Panova I, Kubera J, *et al.* Telomeric DNA induces apoptosis and senescence of human carcinoma cells. *Breast Cancer Research*. 2007. 9:R13.
5. Gibbs JB. Anticancer drug targets: Growth factor and growth factor signaling. *Journal of Clinical Investigation*. 2000. 105(1):9-13.
6. Phosritong N and Ungwitayatorn. Molecular docking study on anticancer activity of plant-derived natural products. *Medical Chemistry Research*. 2010. 19:817-35.
7. Chang FR and Wu YC. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 2001. 64:925-31.
8. Yuan SF, Chang H, Chen H, Yeh Y, Kao YH, Lin KH, *et al.* Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Science*. 2003. 72(25):2853-61.
9. Kim G, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu F, McLaughlin JL, *et al.* Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, *annomuricin E* and *muricapentocin*, from the leaves of *Annona muricata*. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*. 1998. 97(00534):S0163-3864.
10. Chih H, Chiu HF, Tang KS, Chang FR, Wu YC. Bullatacin, a potent antitumour annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. *Life Science*. 2001. 69:1321-31.
11. Teicher BA. Protein kinase C as a therapeutic target. *Clinical Cancer Research*. 2006. 12:5336-45.
12. Korb O, Stutzle T, Exner TE. PLANTS: Protein-ligan ANT system. 2012. diambil dari URL: <http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/plants.php>. diakses 12 Februari, 2012.
13. Prasajo SL, Hartanto FA, Yuniarti N, Ikawati Z, Istyastono EP. Docking of 1-Phenylsulfonamide-3Trifluoromethyl-5-parabromophenyl-pyrazole to cyclooxygenase-2 using PLANTS. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2010. 10(3):348-51.
14. Marcou G and Rognan D. Optimizing fragment and scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2007. 47(1):195-207.