

SENYAWA KUERSETIN SEBAGAI AGEN ANTIKANKER KOLOREKTAL SECARA *IN SILICO*

P.V.P. Putri*, N.M.P. Susanti., dan N. P. L. Laksmiyani

*Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364*

**e-mail: veraphinastika@gmail.com*

ABSTRAK

Kanker kolorektal merupakan kanker ganas yang menduduki peringkat ketiga di Indonesia yang umumnya disebabkan karena pola makan masyarakat Indonesia yang sudah berubah ke makanan tinggi lemak dan rendah serat, serta karena adanya produksi zat karsinogenik dari pemecahan lemak. Pada kondisi kanker kolorektal terjadi overekspresi COX-2 dan penghambatan Caspase-3 yang menyebabkan daya survival sel kanker meningkat karena terhambatnya mekanisme apoptosis. Kuersetin merupakan salah satu senyawa flavonoid yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antitumor dan teruji secara *in vitro* dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker kolorektal WiDr. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui afinitas dan mekanisme senyawa kuersetin terhadap protein target COX-2 dan Caspase-3 sebagai antikanker kolorektal secara *in silico* dengan *molecular docking*. Penelitian dilakukan secara eksploratif dengan tahapan penyiapan *database* struktur 3D kuersetin, serta protein COX-2 dan Caspase-3, optimasi struktur 3D kuersetin, preparasi protein, validasi metode *molecular docking*, serta *docking* kuersetin pada protein – protein tersebut. Hasil *docking* dinilai dari energi ikatan dan ikatan hidrogen yang dihasilkan antara kuersetin dengan protein. Semakin kecil nilai energi ikatan maka ikatan antara kuersetin dengan protein semakin kuat dan stabil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kuersetin memiliki aktivitas sebagai antikanker kolorektal karena mampu menghambat protein COX-2 serta menginduksi Caspase-3 dengan nilai energi ikatan masing-masing yakni -9.54 dan -4.59. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa kuersetin berpotensi menginduksi apoptosis pada kanker kolorektal.

Kata kunci: caspase-3, *in silico*, kanker kolorektal, kuersetin

ABSTRACT

Colorectal cancer is a third rank malignant cancer in Indonesia, generally caused by the diet of the Indonesian people who have change with the consumption of food with high fat and low in fiber, also due to the production of carcinogenic substances from the breakdown of fat. In the condition of colorectal cancer there is overexpression of COX-2 and inhibition of Caspase-3 which causes the increase of cancer cells survival and causes inhibition of apoptosis mechanism. Quercetin is one of flavonoid which known have activity as an antitumor and tested *in vitro* can induce apoptosis on WiDr colorectal cancer cells . The purpose of this study was to determine the affinity and mechanism of quercetin compounds on COX-2 and Caspase-3 target proteins as colorectal anticancer by *in silico* with *molecular docking*. The study was conducted exploratively with the stages of preparing a database of 3D quercetin structures, as well as COX-2 and Caspase-3 proteins, optimization of 3D quercetin structure, protein preparation, molecular docking method validation, and quercetin docking on these proteins. Docking results were assessed from the binding energy and hydrogen bonds that formed between quercetin with proteins. The smaller binding energy value, the stronger the bond between quercetin and proteins is. The results showed that quercetin had an activity as a colorectal anticancer because it was able to inhibit COX-2 and induce Caspase-3 with binding energy values of -9.54 and -4.59. These results showed that quercetin has the potential to induce apoptosis in colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, quercetin, caspase-3, *in silico*

PENDAHULUAN

Penyakit kanker disebabkan oleh pertumbuhan sel yang abnormal secara terus menerus dan tidak terkendali. Kanker ini dapat menjalar ke jaringan sekitar dan dapat

mengalami metastasis (Depkes RI, 2009). Kanker kolorektal merupakan kanker ganas dengan urutan ketiga terbanyak di dunia. Kenaikan tajam kasus kanker kolorektal di Indonesia disebabkan karena pola makan dan pola diet yang bergeser lebih ke *westernisasi*

yang cenderung lebih tinggi lemak dan rendah adanya produksi zat karsinogenik dari pemecahan lemak menjadi asam deoksikolat dan litokolat (Tamba,2012).

Pada kasus kanker kolorektal menunjukkan adanya peningkatan ekspresi dari COX-2 sebesar 77,97% secara signifikan terhadap jaringan kolorektal yang normal. Overekspresi dari COX-2 pada kejadian kanker kolorektal dihubungkan dengan adanya mekanisme inflamasi dengan peningkatan sintesis prostaglandin yang menyebabkan meningkatnya proliferasi sel, terjadinya penghambatan apoptosis, perubahan adesi sel, dan peningkatan metastase (Wu and Sun, 2015; dan Laksmiani,*et al.*,2018).

Salah satu protein yang berperan didalam proses apoptosis yakni *Caspase* sebagai stimulator apoptosis (proapoptosis). *Caspase* efektor yakni *Caspase-3* berfungsi untuk melakukan eksekusi sel dan membelah protein yang menginduksi apoptosis (Nurtami, 2001). *Caspase-3* inilah yang menjadi kunci untuk memulai proses apoptosis sel (Advantus dan Endang, 2013). Oleh sebab itu induksi *Caspase-3* untuk peningkatan apoptosis adalah target kerja yang penting dalam pengobatan kanker kolorektal.

Usaha pengobatan kanker kolorektal telah dilakukan secara intensif yakni dengan pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi, namun pengobatan tersebut masih belum efektif untuk menangani kanker kolorektal. Kegagalan yang sering terjadi utamanya pengobatan dengan kemoterapi dikarenakan rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal dan resistennya sel kanker terhadap agen kemoterapi, menyebabkan timbulnya efek samping yang serius pada penderita kanker kolorektal (Mutiah dkk.,2015). Tujuan dari penelitian ini yakni mengeksplorasi senyawa bahan alam yakni kuersetin untuk pengobatan tertarget pada protein target dengan menghambat COX-2, dan menginduksi *Caspase-3* untuk meningkatkan apoptosis pada sel kanker.

Golongan senyawa yang banyak terdapat di alam dan telah banyak diteliti aktivitasnya sebagai antikanker yakni golongan senyawa flavonoid. Hasil penelitian dari Kusuma dkk(2010) menyatakan bahwa senyawa flavonoid yakni kuersetin memiliki efek sitotoksik dan antiproliferatif pada sel kanker kolon WiDr. Pada uji sitotoksik kuersetin pada sel kanker kolon WiDr, didapatkan bahwa

serat (KEMENKES RI, 2017) serta karena adanya fenomena kematian sel WiDr dengan mekanisme apoptosis yang spesifik pada sel kanker kolon WiDr tanpa terjadinya nekrosis. Oleh karena itu maka kuersetin dapat dikembangkan menjadi obat antikanker kolorektal karena dapat menginduksi apoptosis tanpa terjadinya nekrosis. (Ikawati dan Wibowo, 2008).

Berdasarkan mekanisme terjadinya kanker kolorektal di dalam tubuh,dan potensi kuersetin sebagai antikanker yang dapat menginduksi apoptosis, maka perlu dilakukan eksplorasi kuersetin untuk *cochemotherapy* kanker kolorektal. Oleh karena itu maka perlu dilakukan prediksi aktivitas melalui interaksi suatu protein tertentu terhadap suatu ligan (kuersetin) dengan menggunakan metode *molecular docking* terhadap protein tersebut. Pada penelitian ini dilakukan *molecular docking* aktivitas antikanker kolorektal dari senyawa kuersetin dengan melihat aktivitas molekuler secara selektif dalam menekan COX-2 dan induksi *Caspase-3* yang berperan dalam mengeksekusi apoptosis sel.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam melakukan penelitian ini yakni struktur protein COX-2 (pdb id : 6COX), dan *Caspase-3* (pdb id : 2XZT) yang diunduh dari <http://www.rscb.org>. Selain itu, disiapkan sampel struktur 3 dimensi dari senyawa kuersetin yang diunduh melalui <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/kuersetin> kemudian dipreparasi pada program HyperChem 8.

Alat

Seperangkat komputer dengan spesifikasi *Windows 8 64 bit* dan program Autodock 4.2, Open Babel, Chimera 1.10.1, dan HyperChem 8

Metode Penelitian

Optimasi Struktur 3D Kuersetin

Struktur senyawa kuersetin kemudian diconvert dengan menggunakan Open Babel kemudian dioptimasi dengan menggunakan program HyperChem 8. Metode komputasi

yang digunakan adalah metode komputasi semi-empiris AM1, dan kalkulasi dengan *single point* serta geometri optimisasi.

Preparasi Struktur Protein

Proses preparasi COX-2 dan Caspase-3 dengan memisahkan *native ligand* dari struktur protein menggunakan aplikasi Chimera 1.10.1.

Validasi Metode *Docking Molecular*

Validasi metode *docking molecular* dilakukan dengan men-*docking*-kan kembali *Native ligand* pada protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program Autodock 4.2 dengan parameter RMSD. Jika nilai *Root mean square distances* (RMSD) $\leq 3 \text{ \AA}$, protokol diterima dan *docking* senyawa uji pada protein target dapat dilakukan (Jain dan Nicholls, 2008).

Docking Kuersetin pada Protein COX-2 dan Caspase-3

Senyawa uji kuersetin hasil optimisasi selanjutnya di-*docking*-kan pada protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program Autodock 4.2. Hasil analisis akan menunjukkan konformasi energi ikatan terendah untuk berikatan dengan protein target

Analisis Data

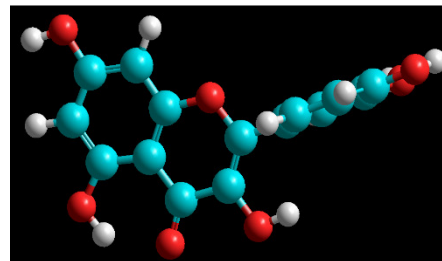
Hasil *docking molecular* adalah energi ikatan. Nilai energi ikatan menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dan reseptor. Semakin rendah harga energi ikatan, maka ikatannya semakin kuat dan stabil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Struktur Kuersetin

Optimasi struktur dilakukan dengan kalkulasi *single point* dan dilanjutkan dengan optimisasi geometri. Kalkulasi *single point* bertujuan untuk mengetahui energi awal dari struktur 3D kuersetin, sedangkan optimisasi geometri bertujuan untuk meminimalisasi energi agar diperoleh struktur yang paling stabil. Hasil energi kalkulasi *single point* dari struktur kuersetin yakni sebesar -3699.526275 kkal/mol. Sedangkan, pada optimisasi geometri terjadi pergeseran struktur senyawa menjadi struktur dalam geometri yang paling stabil, sehingga terjadi penurunan energi struktur kuersetin. Hasil energi yang diperoleh dari hasil optimisasi geometri yakni sebesar

-3711.7329 kkal/mol. Hasil tersebut menunjukkan bahwa optimisasi geometri mampu meminimalisasi energi dari struktur kuersetin. Hasil dari optimisasi struktur kuersetin ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Optimasi Struktur 3 Dimensi Senyawa Kuersetin

Preparasi Protein COX-2 dan Caspase-3

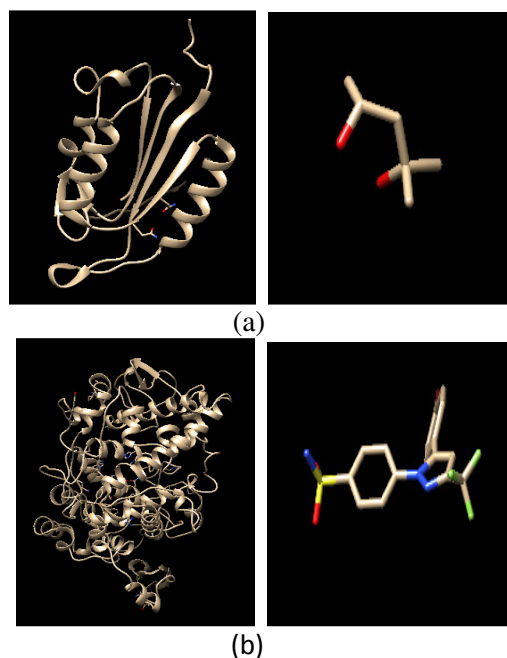
Preparasi dilakukan dengan memisahkan *native ligand* dari struktur protein menggunakan program Chimera 1.10.1 sehingga dihasilkan struktur COX-2 dan Caspase-3 tanpa *native ligand*-nya dan struktur *native ligand* yang terpisah seperti gambar 2. Pemisahan *native ligand* dari struktur protein bertujuan untuk menyediakan *pocket* yang nanti digunakan sebagai ruang tempat berikatan senyawa uji kuersetin pada protein target COX-2 dan Caspase-3.

Validasi Metode

Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan melakukan *re-docking native ligand* yang sudah dipisahkan pada tahap preparasi dengan proteinnya menggunakan aplikasi Autodock 4.2. Tujuan dari validasi metode ini adalah memastikan metode yang digunakan tervalidasi dan memperoleh metode yang baik sehingga dapat digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya). Pada tahap validasi metode ini parameter yang dilihat yakni nilai RMSD yang dihasilkan dari *re-docking native ligand* dengan proteinnya. RMSD (Root Mean Square Deviation) adalah pengukuran dari dua pose dengan melakukan perbandingan posisi atom antara struktur eksperimental dengan struktur yang di-*docking*-kan pada protein (Lestari, 2015). Metode dikatakan valid apabila diperoleh nilai $\text{RMSD} \leq 3 \text{ \AA}$ (Jain and Nicholls.,2008). Semakin kecil nilai RMSD yang diperoleh menunjukkan bahwa pose *ligand* yang yang diprediksi semakin baik karena semakin mendekati konformasi *native ligand*. Sebaliknya jika RMSD yang diperoleh

semakin besar atau berada diatas dari nilai RMSD yang valid maka semakin besar perbedaan konformasi antara pose *ligand* yang diprediksi dengan *native ligand* sehingga semakin besar pula kesalahan prediksi interaksi antara *ligand* dengan protein tersebut (Agistia dkk.,2013; Laksmiani dkk.,2018).

Hasil yang didapat dari validasi ini yakni sepuluh konformasi *ligand* dengan protein dengan nilai RMSD dan energi ikatan yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil validasi metode untuk dua protein yakni COX-2 dan Caspase-3, keduanya mendapatkan konformasi ligand yang memenuhi standar validasi dengan nilai RMSD ≤ 3 . Nilai RMSD untuk masing-masing protein COX-2 dan Caspase-3 berturut-turut yakni 0,73Å dan 1,33Å.



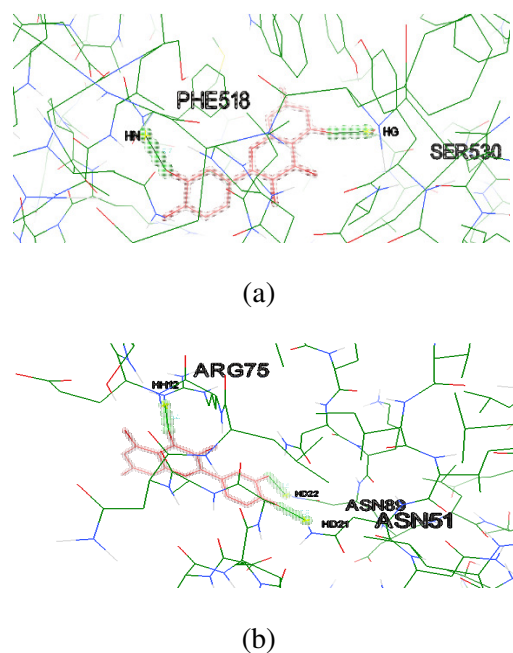
Gambar 2. Struktur Caspase-3 tanpa native ligan (bagian kiri) dan *native ligand* (bagian kanan) (a), struktur COX-2 tanpa *native ligand* (bagian kiri) dan *native ligand* (bagian kanan) (b).

Docking Kuersetin Pada COX-2 dan Caspase-3

Docking kuersetin pada protein target yakni protein COX-2 dan Caspase-3 dilakukan setelah metode *docking* tervalidasi dengan nilai RMSD yang memenuhi yakni ≤ 3 Å. Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan Autodock 4.2 dengan pengaturan koordinat/*grid box* tempat interaksi antara kuersetin dengan protein target yang sesuai dengan

koordinat tempat interaksi *native ligand* pada masing-masing protein. Hasil yang diperoleh dari *docking* kuersetin dengan protein COX-2 dan Caspase-3 yakni berupa energi ikatan dan ikatan hidrogen pada sepuluh konformasi terbaik. Hasil energi ikatan menandakan besarnya afinitas antara kuersetin dengan ketiga protein target. Semakin kecil energi ikatan antara kuersetin dengan protein target, maka ikatan yang dihasilkan semakin stabil.

Konformasi struktur hasil *docking* yang diharapkan adalah konformasi dengan energi ikatan yang paling rendah yang berada pada sisi aktif koordinat pada tempat yang sama dengan posisi *native ligand*. Hasil energi ikatan yang diperoleh dari docking kuersetin terhadap COX-2 dan Caspase-3 berturut-turut yakni -9,54 dan -4,59. Visualisasi hasil docking ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi Hasil Docking Kuersetin dengan COX-2 (a), Kuersetin dengan Caspase-3 (b)

Protein COX-2 dengan kuersetin menghasilkan interaksi berupa ikatan hidrogen pada residu asam amino PHE518 dan SER530. Residu asam amino PHE518 terbentuk melalui gugus HN pada protein dengan gugus O pada kuersetin, dan SER530 terbentuk melalui gugus HG pada protein dan O pada kuersetin. Sedangkan Caspase-3 dengan kuersetin menghasilkan interaksi berupa tiga ikatan hidrogen pada residu asam amino ASN89 melalui gugus HD22 pada protein dan O pada

kuersetin, residu asam amino ARG75 melalui gugus HH12 pada protein dan O pada kuersetin, dan residu asam amino ASN51 melalui gugus HD21 pada protein dan O pada kuersetin.

Energi ikatan yang dihasilkan dari kuersetin terhadap protein COX-2 memiliki energi ikatan yang lebih besar dibandingkan *native ligandnya*. Sedangkan energi ikatan kuersetin dengan Caspase-3 didapatkan lebih kecil dibandingkan dengan *native ligand*. Hal ini menandakan kuersetin lebih stabil berikatan dengan protein Caspase-3 dibandingkan dengan *native ligandnya*. Data perbandingan energi ikatan yang dihasilkan kuersetin dan *native ligand* dapat dilihat pada tabel 1. Hasil yang didapatkan, kuersetin memiliki afinitas pada kedua protein target, sehingga kuersetin memiliki mekanisme molekuler dalam menghambat COX-2 dan menginduksi Caspase-3 melalui ikatan hidrogen yang terbentuk.

Tabel 1. Perbandingan Energi Ikatan antara *Native Ligand* dan Kuersetin Terhadap Protein Target

Protein	Native Ligand	Kuersetin	Ikatan Hidrogen Kuersetin
COX-2	-10,54	-9,54	PHE518 SER530
Caspase-3	-2,49	-4,59	ASN89 ARG75 ASN51

KESIMPULAN

Kuersetin memiliki potensi sebagai agen antikanker kolorektal, secara *in silico* dengan nilai energi ikatan yang terbentuk sebesar -9,54 kkal/mol (COX-2) dan -4,59 kkal/mol (Caspase-3).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen-dosen, keluarga penulis, teman-teman dan semua pihak yang telah sangat membantu dalam penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Adventus, B. dan Endang ,T. 2013. Ekstrak Metanol Daun Kelor Menurunkan Ekspresi BCL-2, TRAIL-R1, dan Kadar Caspase-3 Jaringan Kolon Tikus yang Diinduksi DMBA. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 27: 201-206.
- Agistia, D. D., H. Purnomo, M. Tegar, A. E. Nugroho. 2013. Interaksi Senyawa Aktif dari *Aegle marmelos* Correa sebagai Anti Inflamasi dengan Reseptor COX-1 dan COX-2. *Traditional Medicine Journal*. 18:80-87.
- Depkes RI. 2009. *Buku Saku Pencegahan Kanker Leher Rahim dan Kanker Payudara*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Edwinanto, L., Septiadi, E., Nurfazriah,L.R., Anastasya, K.R., Pranata,N. 2018. Studi Pustaka Fitur Fitokimia Daun Kelor (*Moringa oleifera*) yang Memiliki Efek Antikanker, *Journal of Medicine and Health*. 2: 680-688.
- Ikawati, M. dan Wibowo, A.E. 2008. Pemanfaatan Benalu Sebagai Antikanker, *Laporan Penelitian*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- Jain, A. J., dan A. Nicholls. 2008. Recommendations for evaluational methods. *J. Comput. Aided Mol*. 22: 133-139
- Kementrian Kesehatan. 2017. *Pedoman Pelayanan Nasional Kedokteran Kanker Kolorektal*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Kusuma, A.W., Nurulita, N.A. dan Hartati, D . 2010. Efek Sitotoksik dan Antiproliferatif Kuersetin Pada Sel Kanker Kolon WiDr. *Pharmacy*. 7: 107-122.
- Laksmiani,N.P.L.,Reynaldi,K.R.,Widiastari,M. I.,Nugraha,I.P.W.,Suyadnya,I.M.K., dan Maharani,R.A.I.K. 2018. *Journal of Physics*. 1040: 1-6.
- Laksmiani dkk., 2018. Ethyl Acetate Fraction Of Secang as Anti Cervical Cancer by Inducing P53 and Caspase-9. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* (2018) 012065.
- Lestari, T. 2015. Studi Interaksi Senyawa Turunan 1,3-Dibenzoiltiourea sebagai Ribonukleotida Reduktase Inhibitor. *Jurnal Farmasi Indonesia* 7: 163- 169.

- Mutiah, R., Widyawaruyanty, A. dan Sukardiman. 2015. Ekstrak Etanol Akar Dan Daun Dari Tanaman *Calotropis gigantea* Aktif Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker Kolon Widr Secara *In Vitro*. *Jurnal Farma Sains*. 1: 21-27.
- Nurtami, E.A. 2001. Aspek Molekular Apoptosis : Peran Keluarga BCL-2 dan Keluarga Caspase. *Jurnal Kedokteran Gigi UI*. 8: 51-56.
- Tamba, E. 2012, Karsinogenesis Kanker Kolorektal, Hubungannya dengan Diet dan Mikroflora Usus. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 18: 25-34.
- Wu, Q. B. and Sun, G. P. 2015. Expression of COX-2 and HER-2 in Colorectal Cancer and Their Correlation. *World Journal of Gastroenterology*. 21: 6206-6214.