

UJI *IN SILICO* SENYAWA FLAVONOID KULIT BUAH DELIMA SEBAGAI ANTIKANKER PAYUDARA

K. Ummah^{1*}, I. A. Jariyah¹, dan S. M. Rumengan²

¹Jurusan Pendidikan Ilmu Pengetahuan Alam, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, Surabaya, Indonesia

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia

*Email: khoirotul.ummah@uinsby.ac.id

ABSTRAK

Senyawa flavonoid memiliki aktivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Estrogen- α merupakan salah satu hormon yang berperan dalam perkembangan sel kanker payudara sehingga banyak digunakan sebagai target dalam pengobatan kanker payudara. Pada penelitian ini dilakukan simulasi docking molekuler untuk menguji aktivitas senyawa flavonoid (*apigenin*, *quercetin*, *pelargonidin* dan *cyanidin*) dari kulit buah delima sebagai inhibitor reseptor estrogen- α . Struktur 3D reseptor estrogen- α dari Protein Data Base, sedangkan struktur senyawa flavonoid diperoleh dari PubChem database. Software yang digunakan dalam simulasi docking molekuler yaitu AutoDock Vina dengan beberapa *software* pendukung seperti AutoDockTools 1.5.6, PyMOL dan LigPlot. Hasil docking molekuler menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang diuji dapat menghambat aktivitas reseptor estrogen- α dengan energy ikatan ligan-protein sebesar -8,1 hingga -8,5 kkal/mol. Aktivitas inhibitor 4 senyawa flavonoid tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan *tamoxifen* sebagai senyawa kontrolnya. Potensi senyawa flavonoid juga didukung dengan adanya interaksi hidrofobik dan π - π *stacking* antara senyawa flavonoid dengan asam amino pada sisi aktif protein. Gugus fenol pada senyawa flavonoid juga dapat memperkuat interaksi ligan-protein melalui ikatan hidrogen dengan beberapa residu asam amino Glu353, Arg394, Leu387 dan His524. Berdasarkan hasil uji docking molekuler, dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid dalam kulit buah delima berpotensi sebagai agen antikanker payudara.

Kata kunci: flavonoid, kulit buah delima, kanker payudara, reseptor estrogen- α , docking molekuler.

ABSTRACT

Flavonoids have a high potential to inhibit the growth of cancer cells. Estrogen- α hormones, which play a role in the development of breast cancer cells, are widely used as a target in breast cancer treatment. In this research, molecular docking simulations were carried out to test the activity of flavonoid compounds (*apigenin*, *quercetin*, *pelargonidin*, and *cyanidin*) extracted from pomegranate peel used as inhibitors for the estrogen- α receptors. The 3D structure of the estrogen- α receptors was obtained from the Protein database, and the flavonoid structure was from the PubChem database. The software used in the molecular docking simulation was AutoDockTools 1.5.6, AutoDock Vina, PyMOL, and LigPlot. The results showed that the flavonoid compounds tested could inhibit estrogen- α receptor activity with a ligand-protein binding energy of -8.1 to -8.5 kcal/mol. The inhibitory activity of the four flavonoid compounds, such as *apigenin*, *quercetin*, *pelargonidin*, and *cyanidin*, was higher than the control compound of *tamoxifen*. The potential of flavonoid compounds was supported by the presence of hydrophobic interactions and π - π *stacking* between flavonoid compounds and amino acids on the active site of proteins. The phenol group of flavonoid compounds also strengthened ligand-protein interactions by hydrogen bonds with several amino acid residues Glu353, Arg394, Leu387, and His524. Based on the results of the molecular docking, it can be concluded that the flavonoid compounds in pomegranate peel have the potential to be anti-breast cancer agents.

Keywords: flavonoid, pomegranate rind, breast cancer, estrogen- α receptor, molecular docking.

PENDAHULUAN

Kanker payudara menjadi salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kematian pada wanita (Siegel et al., 2022). Jumlah penderita kanker payudara semakin meningkat dan

menempati urutan pertama dari beberapa kasus kanker di Indonesia (Gautama, 2022). Selama ini terapi kanker payudara telah dilakukan dengan berbagai teknik seperti kemoterapi, pembedahan, hormon dan penggunaan obat-obatan tertentu (Waks & Winer, 2019). Selain menimbulkan

berbagai efek samping, penggunaan teknik tersebut juga masih kurang efektif dalam menghentikan proliferasi sel kanker payudara stadium lanjut (Ko & Moon, 2015). Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai teknik pengobatan kanker payudara yang lebih efektif. Salah satu faktor yang memicu perkembangan sel kanker payudara adalah aktivitas dari estrogen dan reseptor estrogen (Sharma et al., 2018).

Estrogen merupakan hormon yang berperan penting dalam proliferasi epitel payudara. Pada penderita kanker payudara ditemukan peningkatan yang cukup signifikan terhadap aktivitas estrogen dan reseptor estrogen- α (ER- α) (Roy & Vadlamudi, 2012). Aktivitas estrogen yang tidak terkontrol akan meningkatkan proliferasi sel yang tidak normal dan memicu perkembangan sel kanker payudara (Li et al., 2022). Secara umum pasien kanker payudara yang terdiagnosis positif ER- α diberikan terapi endokrin seperti tamoxifen, toremifene dan raloxifene. Akan tetapi penggunaan obat-obatan tersebut secara berkala dapat memicu perkembangan kanker endometrium, dan menyebabkan pembekuan darah serta emboli paru (Sharma et al., 2018). Dengan demikian, eksplorasi senyawa penghambat reseptor estrogen- α yang lebih aman dan memiliki efektivitas tinggi sangat diperlukan.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa flavonoid memiliki potensi yang tinggi sebagai antikanker (Ezzati et al., 2020; Imran et al., 2019). Senyawa flavonoid dapat menginduksi proses apoptosis, mencegah proliferasi dan invasi sel-sel kanker serta berperan dalam sistem regulasi protein kinase yang memicu patogenesis sel kanker (Kopustinskiene et al., 2020). Senyawa turunan flavonoid seperti *epigallocatechin*, *genistein*, dan *resveratrol* dapat menghambat DNA *methyltransferase* dan menginduksi ekspresi gen yang berkontribusi metastasis kanker payudara (Selvakumar et al., 2020). Studi *in silico* juga menunjukkan bahwa senyawa turunan flavonoid seperti *chrysin* dan *peonidin* dapat menghambat aktivitas reseptor estrogen- α dengan afinitas ikatan yang tinggi (Suganya et al., 2014).

Salah satu tanaman yang mengandung senyawa flavonoid adalah delima (*Punica granatum L.*). Dalam kulit buah delima terdapat senyawa golongan flavonoid seperti *apigenin*, *quercetin*, *pelargonidin* dan *cyandin* yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri (Singh et al., 2018). Oleh karena itu untuk menguji potensi senyawa

flavonoid dari kulit buah delima sebagai kandidat antikanker payudara, maka dalam penelitian ini dilakukan uji inhibisi senyawa flavonoid terhadap reseptor estrogen- α melalui docking molekuler.

MATERI DAN METODE

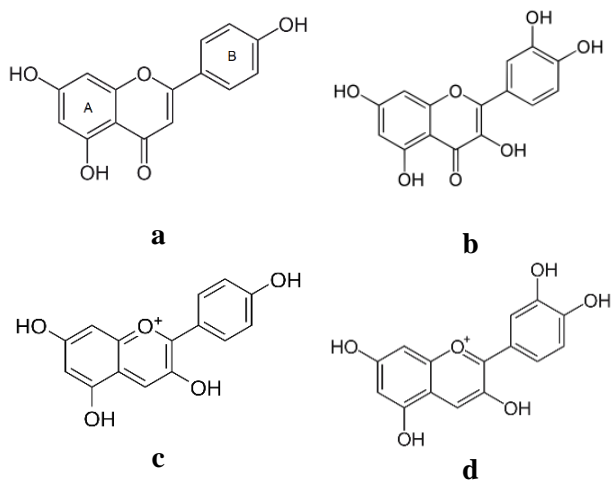
Alat dan Bahan

Perangkat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Laptop Asus Vivobook dengan spesifikasi processor AMD Ryzen 5 3500U, RAM 8.00 GB dan system operasi windows 10. Perangkat lunak yang digunakan adalah AutoDock Vina, AutoDockTools 1.5.6, LigPlot dan aplikasi PyMOL. Struktur 3D protein reseptor estrogen- α (ER- α) diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>) dan ligan yang digunakan dalam penelitian ini berupa senyawa flavonoid dari kulit buah delima yaitu senyawa *apigenin*, *quercetin*, *pelargonidin* dan *cyandin* (Singh, 2018). Struktur 3D ligan tersebut diperoleh dari bank data Pubchem (<https://www.pubchem.com>).

Prosedur

Preparasi Ligan dan Protein

Struktur 3D protein reseptor estrogen- α (ER- α) diunduh dari Protein Data Bank (PDB) dengan kode ID: 5WGQ, sedangkan struktur 3D ligan diunduh dari bank data Pubchem (<https://www.pubchem.com>) dengan kode *cyandin* (CID: 128861), *quercetin* (CID: 5280343), *apigenin* (CID: 5280443), dan *pelargonidin* (CID: 440832) dan. Preparasi awal protein dilakukan dengan *software* Biovia Discovery Studio Client 4.1 untuk membersihkan molekul protein dari molekul-molekul lain seperti molekul air, ligan dan unsur lain yang tidak diperlukan. Struktur protein yang telah dibersihkan selanjutnya ditambahkan muatan dan hidrogen polar menggunakan *software* AutoDockTools serta disimpan dalam format PDBQT. Struktur ligan yang diperoleh dari bank data Pubchem terlebih dahulu dikonversi menjadi format PDB menggunakan *software* Biovia Discovery Studio Client 4.1. Selanjutnya ligan dipreparasi menggunakan AutoDockTools dengan memberikan muatan dan menganalisis rotasi ikatan pada ligan serta menyimpan ulang ligan dalam bentuk PDBQT. Selain itu pada tahapan preparasi ini juga dilakukan pengukuran *gridbox* dengan menyesuaikan bagian sisi aktif protein menggunakan AutoDockTools.



Gambar 1. Struktur senyawa flavonoid dalam kulit buah delima (**a.** *Apigenin*, **b.** *quercetin*, **c.** *pelargonidin*, dan **d.** *cyanidin*)

Validasi Metode Docking Molekuler

Ketepatan metode docking molekuler yang digunakan dalam penelitian ini tergantung dari ketepatan posisi ligan dan kesesuaian ukuran *gridbox* yang telah ditentukan. Untuk mengetahui kesesuaian *gridbox* yang akan dipakai dalam docking molekuler maka dilakukan *redocking* antara protein dengan ligan natif yang diperoleh dari PDB menggunakan AutoDock Vina. Ligan natif hasil *redocking* akan dibandingkan dengan ligan natif asal dari PDB menggunakan *software* PyMOL sehingga dihasilkan nilai *root mean square deviation* (RMSD). Metode docking molekuler yang dilakukan dikatakan valid jika nilai RMSD yang dihasilkan lebih kecil dari 2,0 Å (Morris et al., 2008).

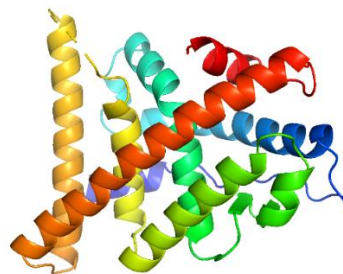
Molecular Docking

Analisis aktivitas inhibisi ligan (senyawa flavonoid) terhadap reseptor estrogen- α dilakukan menggunakan *software* AutoDock Vina. Analisis hasil proses docking molekuler selanjutnya dianalisis dengan *software* PyMOL untuk melihat posisi ligan dalam *pocket* sisi aktif protein ER- α . Jenis interaksi yang terjadi antara ligan dan sisi aktif protein dapat dianalisis menggunakan *software* LigPlot.

HASIL DAN PEMBAHASAN

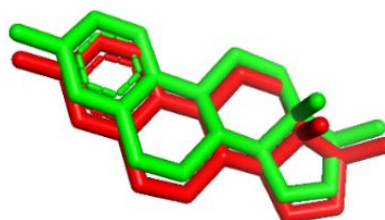
Reseptor estrogen- α merupakan salah satu protein target dalam terapi pengobatan kanker payudara karena berperan langsung dalam proses proliferasi sel-sel kanker payudara (Sharma et al., 2018). Struktur reseptor estrogen- α yang digunakan yaitu reseptor estrogen- α pada manusia

yang diambil dari PDB dengan kode 5WGQ. Adapun struktur protein yang digunakan selama proses docking molekuler adalah struktur protein ER- α rantai A yang terikat dengan ligan natif berupa *estradiol*.



Gambar 2. Struktur 3D protein reseptor estrogen- α (ID: 5WGQ)

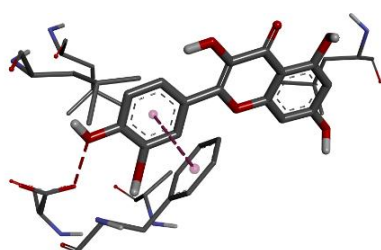
Proses validasi docking molekuler dalam penelitian ini dilakukan menggunakan AutoDock Vina melalui proses *redocking* antara senyawa ligan asal (*estradiol*) dengan protein ER- α . Pengujian ini juga digunakan untuk menentukan kesesuaian ukuran *gridbox* yang dipakai selama proses docking molekuler. Berdasarkan hasil dari proses validasi yang telah dilakukan, terlihat bahwa struktur *estradiol* hasil *redocking* dengan *estradiol* asal telah berhimpit dengan nilai RMSD sebesar 0,636 Å. Hasil ini menunjukkan bahwa ukuran *gridbox* yang digunakan dalam penelitian ini telah sesuai dan metode docking molekuler yang dilakukan telah terbukti valid.



Gambar 3. Visualisasi hasil validasi metode docking molekuler (hijau : ligan natif awal, merah : ligan natif hasil *redocking*)

Potensi senyawa flavonoid dari kulit buah delima sebagai antikanker payudara dapat diukur dari kemampuannya dalam menghambat aktivitas reseptor estrogen- α melalui simulasi docking molekuler. Kemampuan penghambatan terhadap ER- α dianalisis melalui rendahnya energi ikatan dan interaksi yang terjadi antara senyawa ligan dengan sisi aktif protein ER- α . Energi ikatan berpengaruh terhadap kestabilan konformasi kompleks antara ligan protein, dimana semakin rendah energi ikatannya maka semakin stabil kompleks yang terbentuk (Muttaqin et al., 2020).

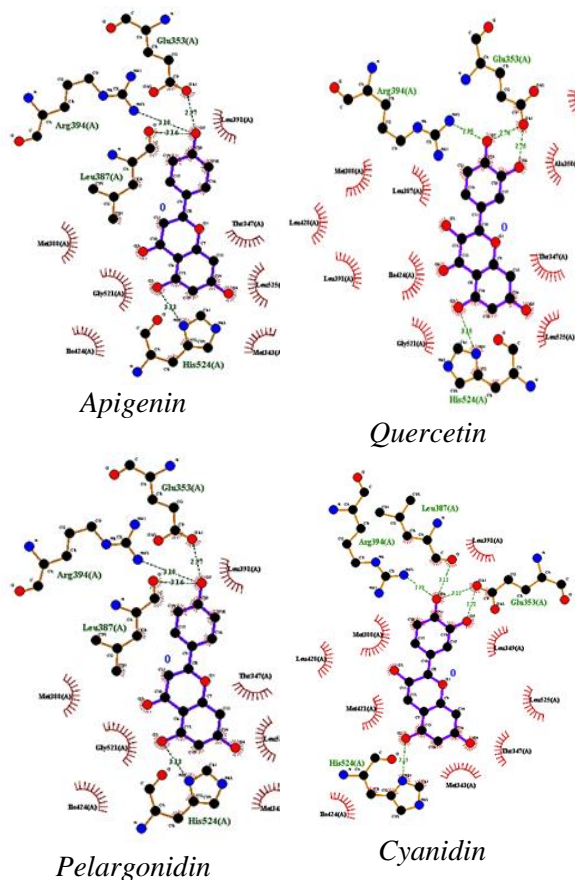
Pada **Tabel 1** terlihat bahwa keempat senyawa flavonoid yang telah diuji memiliki energy ikatan yang identik antara satu senyawa dengan senyawa lainnya yaitu sekitar -8,1 hingga -8,5 kkal/mol. Energi ikatan dari senyawa flavonoid tersebut jauh lebih rendah dibandingkan dengan energy ikatan senyawa *tamoxifen* yang telah digunakan sebagai obat antikanker payudara. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks yang terjadi antara senyawa flavonoid dengan ER- α lebih stabil dibandingkan dengan *tamoxifen*. Oleh karena itu senyawa flavonoid dari kulit buah delima memiliki potensi yang lebih tinggi dalam menghambat aktivitas ER- α dibandingkan dengan *tamoxifen*.



Gambar 4. Interaksi π - π stacking senyawa flavonoid dengan ER- α

Kekuatan penghambatan terhadap reseptor estrogen- α juga ditentukan oleh interaksi yang terjadi antara ligan dengan sisi aktif ER- α . Adanya interaksi seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan π - π stacking dapat memperkuat kompleks yang terbentuk antara ligan dan ER- α (Stanzione et al., 2021). Berdasarkan hasil analisis menggunakan LigPlot pada **Gambar 5**, terlihat bahwa keempat senyawa flavonoid memiliki interaksi yang cukup baik dengan sisi aktif protein jika dibandingkan dengan *tamoxifen*. Secara keseluruhan senyawa flavonoid dapat berikatan hidrogen dengan 4-5 residu asam amino pada sisi aktif ER- α , yaitu asam amino Glu353, Arg394, Leu387 dan His524. Ikatan hidrogen tersebut terbentuk melalui gugus hidroksi pada struktur senyawa flavonoid terutama yang terikat pada cincin aromatik (gugus fenol). Gugus fenol pada senyawa flavonoid ini dapat bertindak sebagai donor ataupun reseptor ikatan hidrogen dengan sisi aktif ER- α . Pada **Gambar 5** juga terlihat bahwa seluruh gugus fenol yang terdapat pada cincin B senyawa flavonoid dapat berikatan hidrogen dengan sisi aktif ER- α . Berdasarkan hasil interaksi ikatan hidrogen antara senyawa flavonoid dan ER- α , dapat dikatakan bahwa adanya gugus fenol pada senyawa flavonoid dapat

meningkatkan aktivitasnya dalam menghambat reseptor estrogen- α .



Gambar 5. Interaksi senyawa flavonoid dengan sisi aktif ER- α

Selain ikatan hidrogen, jumlah interaksi hidrofobik seperti interaksi *van der waals* juga mempengaruhi kestabilan kompleks yang terbentuk antara ligan dan protein. Keempat senyawa flavonoid mampu berinteraksi secara hidrofobik dengan tujuh atau lebih residu asam amino pada sisi aktif ER- α . Kemampuan penghambatan yang cukup baik dari keempat senyawa flavonoid ini juga didukung dengan adanya interaksi π - π stacking antara cincin aromatik B dengan asam amino Phe404 (**Gambar 4**). Berdasarkan keseluruhan hasil uji docking molekuler yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa senyawa flavonoid pada kulit delima memiliki potensi penghambatan yang baik terhadap reseptor estrogen- α . Oleh karena itu senyawa flavonoid yang telah diuji berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat obat antikanker payudara.

Tabel 1. Hasil docking molekuler senyawa flavonoid dari kulit buah delima terhadap reseptor estrogen- α

Senyawa	Energi (kkal/mol)	Ikatan hidrogen	Interaksi hidrofobik
Apigenin	-8,4	Glu353 (2,97 Å), Arg394 (3,10 Å), Leu387 (3,14 Å), His524 (3,13 Å)	Leu391, Thr347, Leu525, Met343, Met388, Gly521, Ile424
Quercetin	-8,5	Glu353 (2,75 Å), Glu353 (2,76 Å), Arg394 (2,95 Å), His524 (3,15)	Leu349, Ala350, Thr347, Met343, Leu525, Met388, Leu387, Ile424, Gly521, Leu428, Leu391
Pelargonidin	-8,2	Leu387 (3,07 Å), Arg394 (3,08 Å), Glu353 (3,00 Å), His524 (3,24 Å)	Met343, Leu525, Thr347, Gly521, Ile424, Met421, Met388, Leu391, Leu428
Cyanidin	-8,1	Glu353 (3,12 Å), Glu353 (2,72 Å), Leu387 (3,12 Å), Arg394 (2,99 Å), His524 (3,15 Å)	Leu391, Leu349, Leu525, Thr347, Met343, Ile424, Met421, Met388, Leu428
Tamoxifen	-4,9	-	Met343, Leu346, Thr347, Ala350, Glu353, Leu384, Leu387, Met388, Leu391, Arg394, Leu349, Phe404, Met421, Ile424, Leu428, Gly521, His524, Leu525

SIMPULAN

Berdasarkan hasil docking molekuler, dapat disimpulkan bahwa 4 senyawa flavonoid yang terkandung dalam kulit buah delima (*Apigenin*, *quercetin*, *pelargonidin*, dan *cyanidin*) memiliki potensi sebagai antikanker payudara. Selain memiliki afinitas energy pengikatan yang lebih rendah dibandingkan *tamoxifen*, senyawa flavonoid dari kulit buah delima dapat berikatan baik dengan sisi aktif reseptor estrogen- α melalui ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan π - π stacking.

DAFTAR PUSTAKA

Ezzati, M., Youse, B., Velaei, K., & Safa, A. 2020. *A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer*. 248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117463>

Gautama, W. 2022. *Breast Cancer in Indonesia in 2022 : 30 Years of Marching in Place*. 1–2.

Imran, M., Rauf, A., Abu-izneid, T., Nadeem, M., Ali, M., Ali, I., Imran, A., Erdogan, I.,

Rizwan, M., Atif, M., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. 2019. *Biomedicine & Pharmacotherapy Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review*. 112. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>

Ko, E.-Y., & Moon, A. 2015. Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer. *Journal of Cancer Prevention*. 20(4): 223–231. <https://doi.org/10.15430/jcp.2015.20.4.223>

Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. 2020. *Flavonoids as Anticancer Agents*. C: 1–25.

Li, Y., Zhang, H., Jiang, T., & Li, P. 2022. *Role of Estrogen Receptor-Positive / Negative Ratios in Regulating Breast Cancer*. 2022.

Morris, G. M., Huey, R., & Olson, A. J. 2008. UNIT using AutoDock for ligand-receptor docking. In *Current Protocols in Bioinformatics*. Issue SUPPL. 24. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24>

Muttaqin, F. Z., Kharisma, D., & Asnawi, A. 2020. *Pharmacophore and Molecular*

- Docking-Based Virtual Screening of B-Cell*. 10(2): 143–147.
- Roy, S. S., & Vadlamudi, R. K. 2012. *Role of Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Metastasis*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/654698>
- Selvakumar, P., Badgeley, A., Murphy, P., Anwar, H., Sharma, U., Lawrence, K., & Lakshmikuttyamma, A. 2020. *Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic*. 1–18.
- Sharma, D., Kumar, S., & Narasimhan, B. 2018. Estrogen alpha receptor antagonists for the treatment of breast cancer: a review. *Chemistry Central Journal*. 1–32. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0472-8>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. 2022. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 72(1): 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. 2018. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chemistry*. 261(April): 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.039>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. 2021. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry*. 1st ed. Vol. 60. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Suganya, J., Radha, M., & Naorem, D. L. 2014. *In Silico Docking Studies of Selected Flavonoids - Natural Healing Agents against Breast Cancer*. 15, 8155–8159.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. 2019. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(3): 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>