

UJI *IN SILICO* SENYAWA 2,6-DIHIDROKSIANTRAQUINON SEBAGAI LIGAN PADA RESEPTOR ESTROGEN ALFA

Felicia Fraulein Setiawan^{*}, Enade Perdana Istyastono
Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Abstract: Previous studies has shown that estrogen receptor alpha that binds to estrogen may increase cancer cell proliferation, thus estrogen receptor alpha can be targeted to cure breast cancer. The aim of this *in silico* study is to test whether phytoestrogen 2,6-dihydroxyanthraquinone is a ligand of estrogen receptor alpha. Setiawati et al. (2014) has established a valid protocol for Structure Based Virtual Screening using molecular docking software PLANTS 1.2. This protocol is used to test 2,6-dihydroxyanthraquinone as ligand for estrogen receptor alpha. Output from the protocol is analyzed using a post-docking analysis method developed by Istyastono (2015) in R 3.0.2. Visualization of binding pose is generated with PyMOL 1.2. Results show that 2,6-dihydroxyanthraquinone cannot be identified as a ligand of estrogen receptor alpha. The method used in this study is not suitable to identify 2,6-dihydroxyanthraquinone, which is a marginal active substance, as active ligand. Further study to develop a suitable method to identify marginal active substances as ligands in estrogen receptor alpha is needed.

Keywords: *In silico*, estrogen receptor alpha, breast cancer, 2,6-dihydroxyanthraquinone

1. Pendahuluan

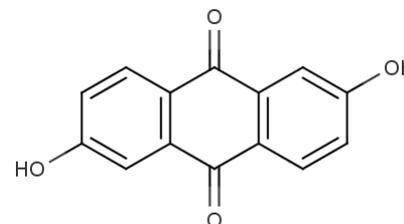
Kanker payudara adalah tumor ganas yang dimulai dari sel payudara. Tumor ganas adalah sekelompok sel kanker yang dapat berkembang ke jaringan sekitarnya atau menyebar hingga bagian tubuh lain (American Cancer Society, 2015). Pada tahun 2012, angka kejadian kanker payudara di Indonesia diperkirakan mencapai 48.998 kasus dengan perkiraan angka kematian 19.750 kasus. Kanker payudara menyebabkan 21.4% kematian dari seluruh kasus kematian yang disebabkan oleh kanker (Youliden, Cramb, Yip, and Baade, 2014).

Estrogen dan reseptor estrogen memiliki peran penting dalam pembentukan dan perkembangan kanker payudara. Ekspresi reseptor estrogen alfa yang lebih besar dari normal merupakan salah satu tanda dari perkembangan sel kanker payudara (Hayashi et al., 2003).

Fitoestrogen adalah senyawa-senyawa yang berasal dari tanaman yang secara struktural atau fungsional mirip dengan estrogen mamalia (Ososki and Kenelly, 2003). Kemiripan struktur dan fungsi fitoestrogen dengan estrogen, yang merupakan ligan alami dari reseptor estrogen dapat dimanfaatkan untuk terapi penyakit yang terkait dengan ekspresi

reseptor estrogen alfa, salah satunya kanker payudara.

Senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon (Gambar 1) adalah salah satu senyawa yang terkandung dalam tanaman *Poligonium cuspidatum*. Senyawa ini telah diuji secara *in vitro* dan menunjukkan adanya aktivitas estrogenik (Matsuda, Shimoda, Morikawa, and Yoshikawa, 2001).



Gambar 1. Struktur senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon

Secara umum, istilah *in silico* digunakan untuk menggambarkan eksperimen yang dilakukan dengan bantuan komputer. Uji *in silico* dapat digunakan untuk mengetahui interaksi antara suatu senyawa dengan molekul target, salah satunya reseptor. Interaksi senyawa dengan reseptor dapat divisualisasikan dengan metode komputasi dan

^{*}Email korespondensi: feliciafraulein@gmail.com

Tabel I. Data Bitstring Pose yang Divisualisasikan

Bitstring	Residu	Interaksi	Aktif/ Inaktif
320	GLY 420	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)	Inaktif
242	ARG 394	Ikatan hidrogen (protein sebagai donor)	Inaktif
117	GLU 353	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)	Inaktif
411	GLY 521	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)	Inaktif
473	CYS 530	Ikatan hidrogen (protein sebagai donor)	Inaktif
105	ASP 351	Interaksi elektrostatik (protein sebagai anion)	Inaktif
201	LEU 387	Ikatan hidrogen (protein sebagai akseptor)	Inaktif
470	CYS 530	Interaksi non polar	Inaktif
170	TRP 383	Aromatis muka-muka	Aktif
171	TRP 383	Aromatis sisi-muka	Inaktif
323	MET 421	Interaksi non polar	Inaktif

dapat digunakan untuk mengetahui pharmacophore dari suatu senyawa (Ekins, Mestres, and Testa, 2007).

Sebelumnya telah ada protokol penapisan virtual yang dapat mengidentifikasi ligan dari reseptor estrogen alfa. Protokol ini telah digunakan untuk mengidentifikasi pose ikatan alfa mangostin di kantung ikatan reseptor estrogen alfa. (Setiawati, Riswanto, Yuliani, and Istyastono, 2014). Istyastono (2015) telah mengembangkan metode analisis paska penambatan untuk menentukan aktif tidaknya suatu senyawa. Metode yang telah ada belum pernah digunakan untuk menguji senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon, sehingga perlu dilakukan uji untuk mengetahui apakah 2,6-dihidroksiantraquinon merupakan ligan pada reseptor estrogen alfa secara *in silico*.

2. Metode Penelitian

Berkas digital struktur senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon diunduh dari zinc.docking.org dengan kode ZINC03860201 dalam format mol2. Senyawa dipersiapkan untuk penambatan dengan aplikasi SPORES (modul: settypes). Luaran dari SPORES ditambatkan dengan menggunakan aplikasi PLANTS 1.2 menggunakan konfigurasi mengacu pada Setiawati *et al.* (2014). Setiap kali penambatan (1 *run*) dilakukan tiga kali iterasi penambatan molekuler, masing-masing menghasilkan 50 pose. Setelah setiap iterasi, diambil satu pose terbaik dan dilakukan analisis interaksi sidik jari dengan PyPLIF. Luaran dari setiap *run* adalah 3 pose berupa skor ChemPLP beserta data *bitstring* PLIF yang kemudian diambil satu pose dengan nilai ChemPLP terbaik. Dilakukan

seribu kali *run* sehingga diperoleh data 1000 pose terbaik masing-masing replikasi.

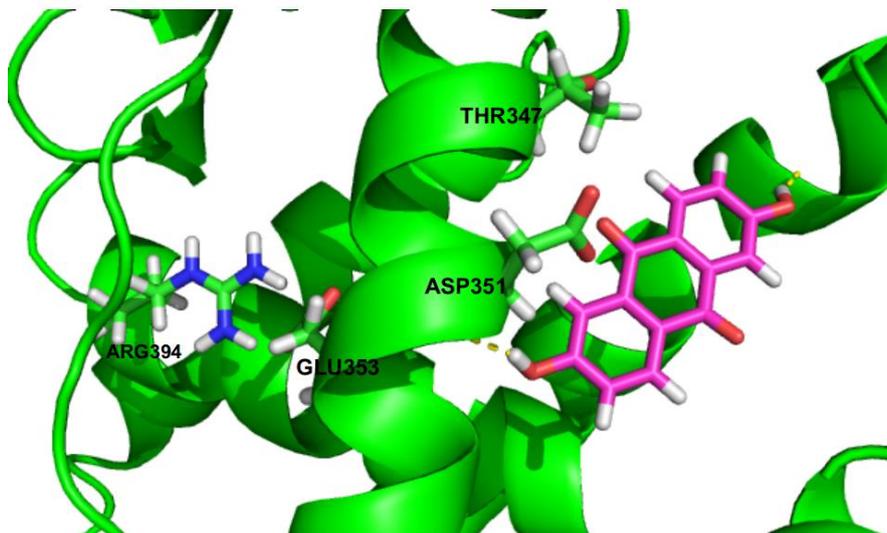
Analisis dilakukan dengan menguji seribu pose hasil penambatan menggunakan perangkat lunak statistik R versi 3.0.2 dengan protokol analisis sesuai yang dikembangkan oleh Istyastono (2015). Luaran yang akan diperoleh adalah *bitstring* yang menunjukkan aktif tidaknya suatu pose. Dengan taraf kepercayaan 95%, data *bitstring* diolah untuk menentukan apakah senyawa uji aktif sebagai ligan pada RE α secara *in silico*.

Visualisasi pose dengan PyMOL 1.2 (Lill dan Danielson, 2011) dilakukan dengan memilih pose dengan kriteria: 1) Pose dengan *bitstring* 320 aktif dan skor ChemPLP terkecil; 2) Pose dengan skor ChemPLP tertinggi. Jika tidak ada pose yang aktif pada *bitstring* 320, dipilih pose dengan skor ChemPLP terkecil saja.

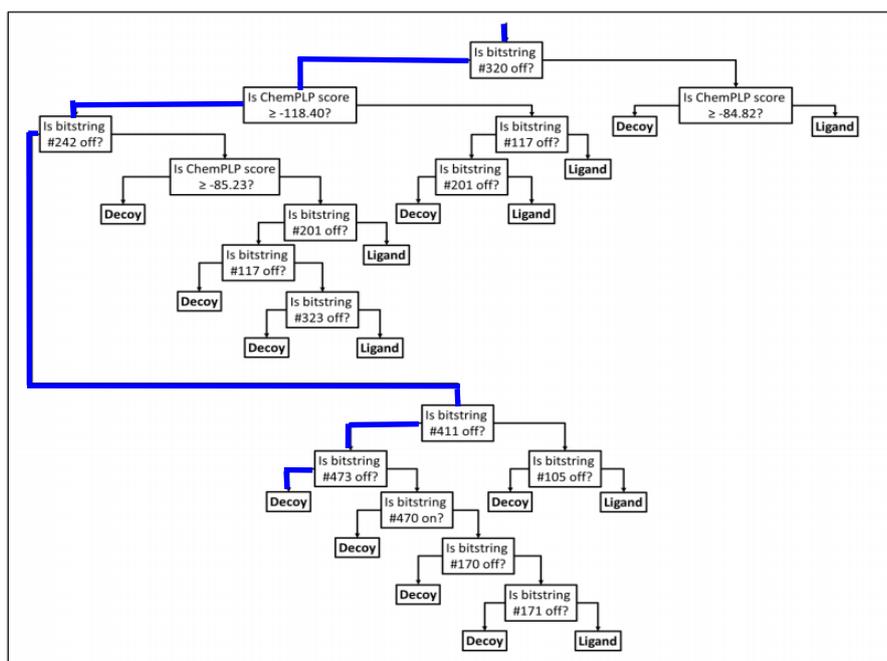
3. Hasil dan Pembahasan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon yang secara alami terdapat dalam tanaman *Polygonium cuspidatum* merupakan ligan yang aktif pada reseptor estrogen α berdasarkan protokol yang dikembangkan Setiawati, *et al.* (2014). Hasil analisis berdasarkan pohon keputusan yang dikembangkan oleh Istyastono (2015) menunjukkan bahwa dari seribu replikasi penambatan, tidak ditemukan satupun pose yang aktif.

Hasil data luaran PyPLIF menunjukkan tidak ada pose yang aktif pada *bitstring* 320 (GLY 420). Visualisasi pose pada senyawa 2,6-



Gambar 2. Visualisasi pose 2,6-dihidroksiantraquinon di RE α . Senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon ditunjukkan oleh struktur berwarna merah muda. Interaksi polar ditunjukkan garis putus-putus berwarna kuning.



Gambar 3. Analisis dengan pohon keputusan. Jika jawaban “ya” maka mengarah ke kiri, jika “tidak” ke kanan. Garis biru menunjukkan alur pembuatan keputusan apakah senyawa merupakan ligan atau pengecoh.

dihidroksiantraquinon dilakukan dengan menggunakan pose replikasi ke-680 yang memiliki skor ChemPLP terkecil, yaitu -76,9761.

Visualisasi pose dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak PyMOL. Hasil visualisasi menggambarkan interaksi 2,6-dihidroksiantraquinon dengan residu yang terdapat di kantung ikatan RE α . Terdapat interaksi polar antara senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon dengan

rantai utama protein reseptor (Gambar 2). Senyawa uji tidak berikatan dengan residu-residu yang berperan penting interaksi ligan-protein di kantung ikatan RE α sehingga senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon tidak dapat dideteksi sebagai ligan. Analisis dengan menggunakan *decision tree* berdasarkan data bitstring (Tabel 1) yang dikembangkan oleh Istyastono (2015) juga menunjukkan bahwa senyawa 2,6-

dihidroksiantraquinon bukan merupakan ligan RE α (Gambar 3).

Senyawa dapat dikatakan sebagai ligan aktif bila memiliki nilai afinitas kurang dari 1 μ M (Mysinger, et al., 2011). Senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon memiliki nilai afinitas K_i 0,31 μ M (Matsuda, et al., 2001) yang berarti dengan cutoff 1 μ M, senyawa ini merupakan ligan aktif. Akan tetapi, 2,6-dihidroksiantraquinon juga memiliki nilai afinitas lain, yaitu IC₅₀ yang nilainya 1,1 μ M (Matsuda, et al., 2001). Berdasarkan nilai IC₅₀, 2,6-dihidroksiantraquinon bukan merupakan ligan, melainkan termasuk dalam golongan senyawa marjinal aktif. Hasil percobaan menunjukkan bahwa senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon bukan merupakan ligan aktif untuk RE α . Senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon dapat masuk ke dalam kategori senyawa aktif maupun marjinal, akan tetapi data penelitian menunjukkan bahwa 2,6-dihidroksiantraquinon lebih cenderung masuk ke dalam golongan senyawa marjinal. Ketidakmampuan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi 2,6-dihidroksiantraquinon sebagai ligan aktif di RE α menunjukkan bahwa protokol yang digunakan masih belum cukup sesuai untuk mendeteksi senyawa marjinal aktif sebagai ligan.

4. Kesimpulan

Senyawa 2,6-dihidroksiantraquinon bukan merupakan ligan aktif dari reseptor estrogen alfa secara *in silico* berdasarkan protokol yang dikembangkan oleh Setiawati, *et al.* (2014) dan analisis pasca penambatan yang dikembangkan oleh Istyastono (2015). Senyawa ini termasuk dalam senyawa marjinal aktif yang belum dapat dideteksi oleh protokol yang digunakan. Perlu dikembangkan metode yang dapat mengidentifikasi senyawa marjinal aktif sebagai ligan secara *in silico* di RE α .

Daftar Pustaka

- American Cancer Society, 2015. Breast Cancer, <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>, diakses tanggal 23 Maret 2014.
- Ekin, S., Mestres, J., Testa, B., 2007. In Silico Pharmacology For Drug Discovery: Methods For Virtual Ligand Screening And Profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152, 9-20.
- 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. *Endocrine-Related Cancer*, 10, 193-202.
- 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), 207-210.
- Lill, M.A., and Danielson, M.L. 2011. Computer-aided Drug Design Platform Using PyMol. *J. Comput. Aided Mol.*, 25(1), 13-19.
- Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T., Yoshikawa, M., 2001. Phytoestrogens from the Roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): Structure-Requirement of Hydroxyanthraquinones for Estrogenic Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 1839-1842.
- Mysinger, M.M., Carchia, M., Irwin, J.J., and Schoichet, B.K., 2012. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 6582-6594.
- Ososki, A.L., and Kenelly, E.J., 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research*, 17, 845-869
- Setiawati, A., Riswanto, F.D.O., Yuliani, S.H., Istyastono, E.P., 2014. Retrospective Validation of A 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.
- Youlden, D.R., Cramb, S.M., Yip, C.H., Baade, P.D., 2014. Incidence and Mortality of Female Breast Cancer In The Asia Pacific Region. *Cancer Biology & Medicine*, 11(2), 101-115.