

PREDIKSI AKTIVITAS ANTIKANKER PAYUDARA SENYAWA FEVICORDIN DARI BIJI *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. PADA ESTROGEN RECEPTOR- α (ER α) MELALUI METODE HUBUNGAN KUANTITATIF STRUKTUR DAN AKTIVITAS

Muchtaridi¹, Mutalib, A.,² Levita, J., Diantini, A.,¹ dan Musfiroh, I.¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran,

²PRR BATAN, Serpong.

E-mail: muchtaridi@unpad.ac.id

ABSTRAK

Pada penelitian ini, fevicordin dikembangkan sebagai antikanker payudara. Pengembangan dilakukan melalui pendekatan Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA) dengan teknik Analisis Regresi Linier Berganda (ARLB) pada 37 senyawa analog estrogen dengan persamaan hasil HKSA: $\text{Log Ki} = -16,5348 + 9,4000 \text{ Ovalitas} - 0,0472 \text{ Volume Molar} - 1,3985 \text{ Energi Dipol} + 0,4891 \text{ Panjang Dipol} + 0,00001 \text{ Energi Torsi} + 0,0113 \text{ Area Total}$. Persamaan tersebut digunakan untuk memprediksi nilai konstanta inhibisi (Ki) senyawa fevicordin, dibandingkan dengan nilai Ki hasil penelitian Nakata *et al* melalui metode *radioligand binding assay*. Adapun nilai Ki hasil penelitian Nakata dkk adalah $6,13 \times 10^{-15} \text{M}$ (media buffer tris dan kompetitor 3H-estradiol), sedangkan nilai Ki prediksi berdasarkan HKSA adalah $7,38 \times 10^{-15} \text{M}$. Data ini menunjukkan bahwa metode HKSA (ARLB) dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas antikanker payudara fevicordin.

Kata kunci: kanker payudara, RE α , fevicordin, Ki, HKSA

PREDICTION OF ANTIBREAST CANCER ACTIVITY OF FEVICORDIN FROM *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. SEEDS AGAINST ESTROGEN RECEPTOR- α (ER α) BY USING QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP METHOD

ABSTRACT

In this study fevicordin is proposed to be used as anti breast-cancer. The development of this compound was based on Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) study of 37 estrogen analogues using MLRA (Multiple Linier Regression Analysis) which equation is: $\text{Log Ki} = -16.5348 + 9.4000 \text{ Ovality} - 0.0472 \text{ Molar Volume} - 1.3985 \text{ Dipole Energy} + 0.4891 \text{ Dipole Length} + 0.0000 \text{ Torsion Energy} + 0.0113 \text{ Total Area}$. The equation was used to predict fevicordin's Ki value, and compared with Ki experiment which had been performed using radioligand binding assay by Nakata and his colleagues. The Ki value resulted from Nakata's work was $6.13 \times 10^{-15} \text{M}$ (in Tris buffer using 3H-estradiol as competitor), while Ki prediction based on QSAR was $7.38 \times 10^{-15} \text{M}$. This data indicated that QSAR method (MLRA) could be used to predict antibreast cancer activity of fevicordin.

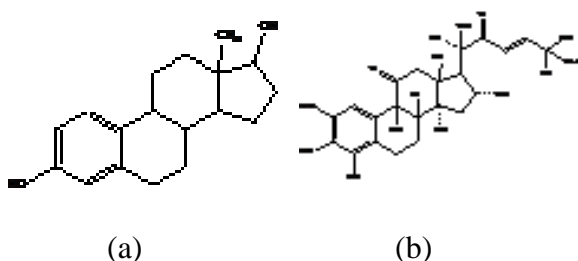
Key words: fevicordin, breast cancer, ER α , Ki, QSAR

PENDAHULUAN

Penelitian lima tahun terakhir ini, senyawa dari bahan alam turunan estradiol (fitoestrogen) seperti isoflavon daidzein, genistein, (de Lemos, 2001) dan yang terbaru glabridin (Tamir *et al.*, 2000) menjadi senyawa yang dapat mencegah perkembangan sel kanker (*antiproliferative*), karena ikatan senyawa-senyawa tersebut dengan reseptor estrogen lebih kuat dibandingkan estradiol. Namun, senyawa-senyawa ini belum mampu membunuh sel

kanker yang telah berkembang di dalam jaringan mammae (Fujita *et al.*, 2003). Hal ini dikarenakan bahwa senyawa-senyawa aktif dari bahan alam hasil isolasi bukanlah suatu langkah akhir dalam penemuan obat baru (Sager and Lengauer, 2003). Dalam tahapan penemuan obat baru (*New Drug Discovery*), penemuan senyawa aktif dari bahan alam (*lead compound*) merupakan langkah ke empat dari sepuluh langkah menuju obat baru yang dapat diproduksi secara komersil (Graham, 2005, Ji *et al.*, 2009). Langkah selanjutnya adalah memprediksikan aktivi-

tas dan afinitas ikatan dengan reseptor senyawa aktif tersebut dengan menggunakan Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA). Prediksi aktivitas dan afinitas ikatan dengan reseptor menggunakan *KiBank* sebagai respon dalam persamaan HKSA akhir-akhir ini sedang ramai dibicarakan. Konstanta inhibisi (K_i) merupakan nilai *binding affinity* antara struktur 3D molekul obat dengan reseptor. Konsep ini dikembangkan dari database reseptor (RDB) (Zhang *et al.*, 2004). Nilai K_i setiap reseptor sangat tergantung pada kondisi rinci eksperimen, seperti jaringan targetnya, substrat, pH dan buffer eksperimen basah penentuan afinitas ikatan obat-reseptor (Aizawa *et al.*, 2004).



Gambar 1. Struktur estradiol (a) dan fevicordin dari biji mahkota dewa (b)

Fevicordin (Gambar 1b) merupakan senyawa aktif bahan alam dari biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) memiliki potensi besar dalam mencegah dan membunuh sel kanker payudara, jika senyawa ini dioptimasi menjadi senyawa aktif obat. Senyawa yang berkerangka inti estradiol ini memiliki toksisitas terhadap sel kanker. Selain senyawa tersebut sangat toksik terhadap sel kanker. Dari hasil percobaan, nilai IC_{50} fevicordin terhadap sel Hela adalah 1,25 $\mu\text{g/mL}$, terhadap sel CASKI 12 $\mu\text{g/mL}$, dan terhadap sel TE-2 adalah 40 $\mu\text{g/mL}$ (Diantini *et al.*, 2007a, Diantini *et al.*, 2007b). Pada penelitian ini, dilakukan prediksi nilai K_i senyawa fevicordin terhadap sel kanker payudara melalui HKSA berbantuan komputasi menggunakan Hyperchem 7[®] 3D dan PCMODEL[®].

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan pada kajian HKSA berupa data struktural dan aktivitas biologis yang diambil dari pustaka. Penelitian ini menggunakan metode kimia komputasi untuk mengeksplorasi semua data prediktor. Uji sitoksisitas digunakan dengan metode MTT.

Kimia Komputasi: Perangkat keras satu set komputer digunakan dalam penelitian ini dalam melakukan perhitungan kimia komputasi. Perangkat lunak paket program *Hyperchem*[™] 7.0 for Windows (Hyperchem, Inc) untuk melakukan perhitungan molekular mekanik (MM+) dan mengeksplorasi sifat fisikokimia. Perangkat lunak *PC Model v6.0 for Windows* (v 6.0; Serena Ltd), dan *Statistica* (v6.0; Statsoft, Inc.) untuk melakukan analisis statistik. *CS Chem3D Ultra Molecular Modelling and Analysis Program* (v8.0; CambridgeSoft Corporation), *PC Model, AutoGrid* (v3.05; The Scripps Research Institute), *Autodock* (v3.0.5) dan *Autodock Tools* (v1.4.4; The Scripps Research Institute, *Molecular Graphic Laboratory*), *Swiss-PdbViewer* (v3.7).

Bioassay:ELISA (Boehringer), Spektrometer (Shimadzu), 96-well plate dilengkapi *microplate reader*, mikropipet, sentrifugasi, dan inkubator.

HKSA: 37 senyawa derivat estrogen (Nakata, 2007) yang bersifat agonis terhadap reseptor estrogen α pada manusia, masing-masing dengan nilai konstanta inhibisi (K_i) diperoleh dari bank data (Nakata, 2007). Nilai konstanta ini merupakan hasil pengujian in vitro dengan metoda kompetisi *radioligand binding assay* (RBA) menggunakan estradiol bertanda dengan Tris buffer yaitu [³H]17beta-estradiol (buffer:tris 2.0nM; fosfat 2.0nM) (Nakata, 2007). Dalam skala ini, estradiol dinyatakan memiliki % afinitas ikatan terhadap reseptor estrogen α sebesar 100%. Tabel 1 memperlihatkan jenis turunan atau derivat estradiol beserta nilai konstanta inhibisinya (K_i).

Pemodelan HKSA: Masing-masing senyawa kemudian dibuat model dengan menggunakan program *Hyperchem*[™] 7.0 sehingga diperoleh model molekul tiga

dimensi. Kemudian dilakukan minimisasi energi agar diperoleh model molekul dengan energi molekul yang paling kecil dengan menggunakan MM2. Setiap pengukuran deskriptor dilakukan minimisasi energi agar perhitungan deskriptor yang diperoleh akurat sesuai dengan sifat molekul yang dimodelkan. Pemilihan deskriptor: dilakukan dengan mempertimbangkan hubungan struktur senyawa terhadap aktivitas farmakologi, sehingga deskriptor yang dipilih berkaitan dengan kerangka dari senyawa literatur. Deskriptor yang digunakan dihitung menggunakan program HyperchemTM 7.0 dan *software* PCMODEL. Deskriptor yang digunakan adalah dipole (DPL), *dipole length* (DPLL), *the Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO), *the Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (LUMO), *dipole-dipole energy* (Ed), *ovality*, *molar volume*, *torsion energy* (Et), *partition coefficient* (octanol/water), *total area*, *polar area*.

Analisis komponen utama (Statistica v.6.0) dilakukan untuk mereduksi variabel independen (deskriptor) agar diperoleh variabel independen yang memiliki nilai variansi yang tinggi sehingga dapat menjelaskan variansi yang terjadi pada variabel dependen (aktivitas). Analisis regresi linear berganda (Statistica v.6.0) digunakan untuk meramalkan variabel dependen berdasarkan beberapa variabel independen dalam suatu persamaan linear. Analisis regresi dengan kuadrat terkecil sebagian digunakan untuk mengatasi masalah yang terjadi dalam analisis regresi linear berganda. Metode ini dapat mereduksi terjadinya kolinearitas dan autokorelasi.

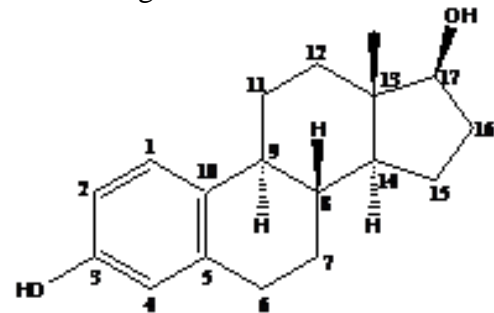
Prediksi aktivitas Fevicordin: Struktur 3 dimensi senyawa fevicordin dimodelkan dengan menggunakan perangkat lunak program HyperchemTM 7.0, kemudian ditentukan deskriptor senyawa fevicordin yang telah

terdefiniskan oleh model persamaan regresi HKSA turunan estradiol. Deskriptor yang tidak bisa ditentukan oleh perangkat lunak program HyperchemTM 7.0 ditentukan dengan menggunakan perangkat lunak PCModel Ver.6. Semua deskriptor tersebut kemudian dimasukkan kedalam persamaan model regresi HKSA turunan estradiol, sehingga nilai tetapan inhibisi fevicordin dapat diprediksi melalui model.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA) Derivat Estrogen

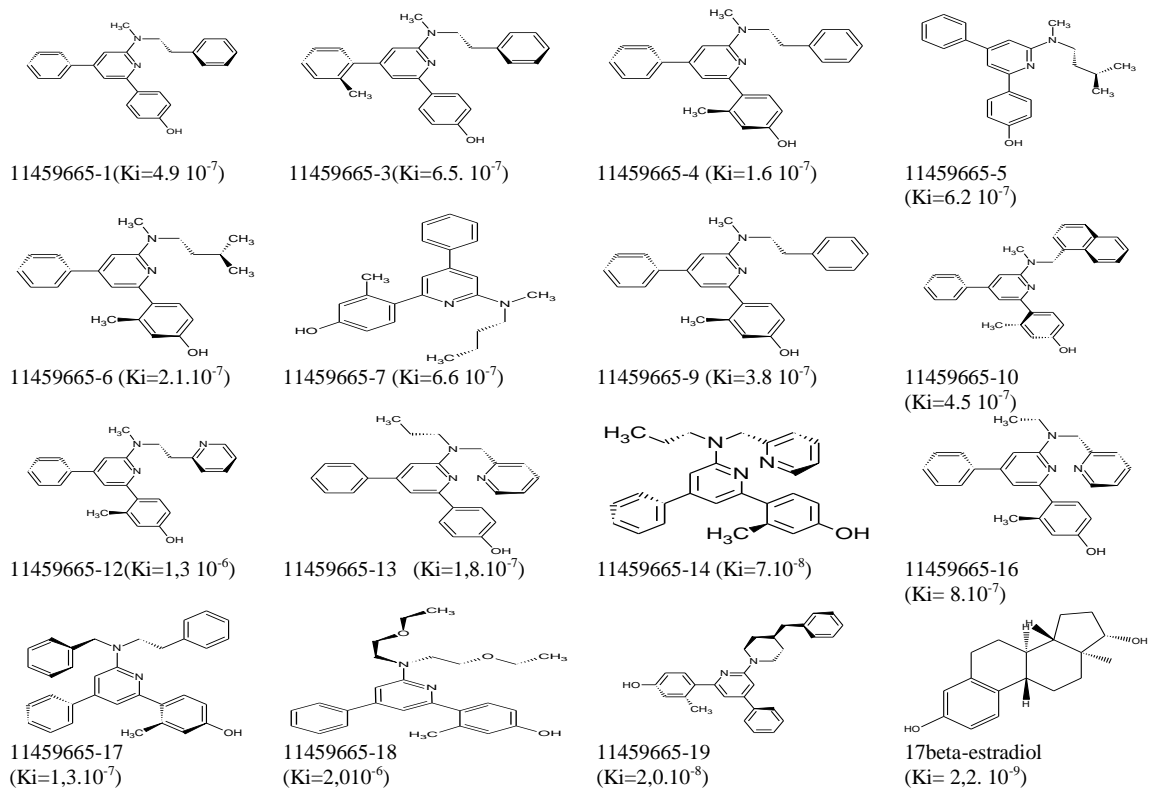
Senyawa penuntun yang digunakan adalah senyawa estradiol 17- β dengan struktur sebagai berikut :



Gambar 2. Senyawa Penuntun Derivat Estrogen

Data aktivitas senyawa derivat estrogen diperoleh dari bank data Ki (Nakata *et al.*, 2007). Nilai konstanta Ki senyawa derivat diperoleh dari hasil pengujian *in vitro* dengan membandingkan senyawa menggunakan 2 senyawa bertanda, [³H]17beta-estradiol (buffer: tris 2,0nM; fosfat 2,0nM) pada reseptor estrogen alpha (RE α) pada manusia.

Pada Gambar 3 dapat dilihat data nilai aktivitas Ki dari derivat estrogen terhadap RE α manusia.



Gambar 3. Struktur dan aktivitas derivat estrogen dibandingkan terhadap [3 H]17 beta-estradiol

Tabel 1. Korelasi HKSA senyawa uji 1

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(9)	p-level
Intercept			-16.5348	2.441036	-6.77366	0.000081
Ovality	1.05877	0.285339	9.4000	2.533295	3.71058	0.004841
Molar Vol	-2.07151	0.499833	-0.0472	0.011392	-4.14441	0.002505
Ed	-0.91454	0.187790	-1.3985	0.287174	-4.86999	0.000884
DPLL	0.37241	0.119347	0.4891	0.156740	3.12038	0.012311
Et	0.22320	0.114594	0.0000	0.000002	1.94775	0.083268
Total Area	0.91792	0.538005	0.0113	0.006636	1.70615	0.122166

Model HKSA:

Log K_i = -16.5348 + 9.4000 Ovalitas - 0.0472 Volume Molar - 1.3985 Energi Dipol + 0.4891 Panjang Dipol + 0.0000 Energi Torsi + 0.0113 Total Area

R = 0,95106569 R²= 0,90452595

F(6,9) = 14,211 p<0,00039 Estimasi Std.Kesalahan: 0,29425

Pada data Gambar 3 diatas, terdapat perbedaan nilai K_i untuk senyawa yang sama, hal ini dikarenakan adanya perbedaan kondisi percobaan, yaitu adanya perbedaan senyawa *tracer* (pembanding) dan larutan penyangga yang digunakan. Perbedaan kondisi percobaan ini sangat mempengaruhi nilai K_i pada setiap senyawa uji, sehingga akan mempengaruhi berapa persen reseptor yang diduduki senyawa uji dibandingkan

dengan *tracer*. Senyawa yang digunakan bersifat agonis terhadap RE α .

Nilai K_i berbanding lurus dengan nilai IC₅₀ senyawa. Jadi, nilai K_i yang kecil memiliki aktivitas yang baik.

Penentuan dan Penghitungan Deskriptor

Dari analisis komponen utama ini dihasilkan beberapa deskriptor yang memiliki nilai variansi yang besar, yaitu ovalitas, volume molar, energi dipol,

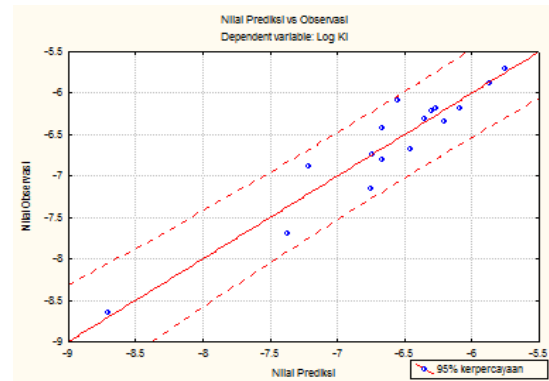
panjang dipol, energi torsi, dan total area untuk senyawa uji 1; homo, polar area, dipole, dan total area untuk senyawa uji 2. Jumlah deskriptor yang digunakan dalam penghitungan maksimal berjumlah $n-1$ dari jumlah sampel yang digunakan dalam percobaan. Pengurangan jumlah deskriptor yang digunakan agar diperoleh perhitungan persamaan regresi yang baik dilakukan melalui bantuan PC Model v.6.

Data hasil analisis regresi linier berganda untuk [^3H]17beta-estradiol

Dari enam belas senyawa uji (Gambar 3), menghasilkan suatu hubungan korelasi bermakna. Deskriptor yang berpengaruh dalam hubungan korelasi ini adalah ovalitas, volume molar, energi dipol, panjang dipol, energi torsi, dan total area.

Dari hasil regresi diatas, dapat disimpulkan bahwa nilai Ki dipengaruhi oleh ovalitas, volume molar, energi dipol, panjang dipol, energi torsi, dan total area. Nilai R^2 ($R^2 \geq 0,90$) menunjukkan adanya hubungan bersifat linier yang bermakna antara aktivitas nilai Ki dengan deskriptor dan model dapat menjelaskan 90,4% variabel tak bebas (konstanta inhibisi). Nilai F dapat dibandingkan dengan nilai F tabel untuk menentukan nilai keberartian model regresi. Diperoleh hasil pengujian model regresi F 14,211. Nilai F tabel adalah 3,37 ($\alpha = 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa model regresi linier berganda sesuai untuk menjelaskan hubungan antara deskriptor dengan konstanta inhibisi. Nilai p (signifikansi) regresi adalah 0,00039. Nilai signifikansi ini menjelaskan nilai residual dari analisis model regresi yang dilakukan. Nilai signifikansi model lebih kecil dari nilai α (0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa model regresi linier berganda sesuai untuk menjelaskan hubungan antara deskriptor dengan konstanta inhibis (Saxena and Prathipati, 2003).

Dilihat dari nilai residu yang diperoleh dari selisih hasil prediksi dari model HKSA dengan nilai Ki hasil penelitian Nakata dkk, menunjukkan nilai residu memenuhi syarat (standar kesalahan 1%) (Gambar 4), ditunjukkan dengan nilai prediksi senyawa mendekati garis linier.



Grafik 4. Nilai Prediksi dan Observasi Senyawa Derivat Estrogen

Prediksi Konstanta Inhibisi Senyawa Fevicordin

Nilai prediksi ditentukan setelah memasukkan data fisikokimia fevicordin seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1 ke dalam persamaan di atas. Nilai Ki fevicordin sangat kecil berarti fevicordin berpotensi sebagai senyawa anti kanker payudara. Data ini bisa dibandingkan dengan data skoring dari docking fevicordin. Tetapi dengan model ini kita tidak bisa mengetahui bagaimana kekuatan ikatannya dengan reseptor (Salum Lde *et al.*, 2007). Oleh karena itu dilakukan docking untuk mengetahui nilai Ki berdasarkan hasil docking dan energi ikatannya dengan RE α manusia (Morris *et al.*, 2008).

Tabel 3. Data deskriptor senyawa fevicordin

Deskriptor	Satuan	Nilai
Ovality		1,50262
Partition		
Coefficient (O/W)		3,8226
Dipole-dipole		
Energy	Kcal/mol	2,61312
Torsion Energy	Kcal/mol	13,0796
Dipole	Debye	4,8473
Dipole Length	eV	4,8473
HOMO	eV	-8,436
LUMO	eV	-0,355
Total Area		638,762
Polar Area		159,494
Molar Volume		375

Tabel 4. Nilai Ki senyawa fevicordin

Tracer	Nilai Ki
[3H]17beta-estradiolFosfat	7,38.10 ⁻¹⁵

SIMPULAN

Nilai Ki fevicordin terhadap reseptor estrogen- α berdasarkan HKSA dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas antikanker payudara fevicordin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih pada Rektor dan Ketua Lemlit Universitas Padjadjaran yang telah mendanai seluruh penelitian ini lewat Hibah Penelitian Andalan UNPAD 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Aizawa, M., Onodera, K., Zhang, J., Amari, S., Iwasawa, Y., Nakano, T. & Nakata, K. 2004. (KiBank: a database for computer-aided drug design based on protein-chemical interaction analysis). *Yakugaku Zasshi*, 124, 613-9.
- De Lemos, M. L. 2001. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother*, 35, 1118-21.
- Diantini, A., Kurnia, D., Faried, A., Faried, L. S., Subarnas, A., Achmad, T. H., Hayashi, H. & Supriyatna. 2007. Anti-proliferative activity on hela and CASKI cells of fevicordin A isolated from the seeds of *Phaleria macrocarpa*. *In: Conference On Traditional Medicine And Medicinal Plant*, 8-9 September 2007a Surabaya. Unair.
- Diantini, A., Kurnia, D., Faried, A., Faried, L. S., Subarnas, A., Achmad, T. H., Hayashi, H. & Supriyatna. 2007. Anti-proliferative activity on TE-2 cells of fevicordin A isolated from the seeds of *Phaleria macrocarpa*. *In: Seminar Kebudayaan Indonesia Malaysia X*, 29-31 September 2007b Kuala Lumpur.
- Fujita, T., Kobayashi, Y., Wada, O., Tateishi, Y., Kitada, L., Yamamoto, Y., Takashima, H., Murayama, A., Yano, T., Baba, T., Kato, S., Kawabe, Y. & Yanagisawa, J. 2003. Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem*, 278, 26704-14.
- Graham, P. L. (Ed.) 2005. *Introductory Medicinal Chemistry*, New York: Oxford University Press.
- Ji, H. F., Li, X. J. & Zhang, H. Y. 2009. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Rep*, 10, 194-200.
- Morris, G. M., Huey, R. & Olson, A. J. 2008. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 8, Unit 8 14.
- Nakata, K. 2007. *Revolutionary simulation software, quantum molecular interaction analysis, BioStation KiBank* [Online]. Available: <http://kibank.iis.u-tokyo.ac.jp/> [Accessed 28 Agustus 2007].
- Sager, J. A. & Lengauer, C. 2003. New paradigms for cancer drug discovery. *Cancer Biol Ther*, 2, 452-5.
- Salum Lde, B., Polikarpov, I. & Andricopulo, A. D. 2007. Structural and chemical basis for enhanced affinity and potency for a large series of estrogen receptor ligands: 2D and 3D QSAR studies. *J Mol Graph Model*, 26, 434-42.
- Saxena, A. K. & Prathipati, P. 2003. Comparison of MLR, PLS and GA-MLR in QSAR analysis. *SAR QSAR Environ Res*, 14, 433-45.

Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Stern, N., Shelach, R., Kaye, A. & Vaya, J. 2000. Estrogenic and anti-proliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 60, 5704-9.

Zhang, J., Aizawa, M., Amari, S., Iwasawa, Y., Nakano, T. & Nakata, K. 2004. Development of KiBank, a database supporting structure-based drug design. *Comput Biol Chem*, 28, 401-7.