

PERBANDINGAN INHIBISI BRUSEIN D TERHADAP PROTEIN NF_κB PADA SEL KANKER PANKREAS SECARA FLEKSIBEL DAN *RIGID DOCKING*

Harry Noviardi^{1*}, Armi Wulanawati², Muhamad Sholehuddin Malik Ibrohim²

¹Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi, Bogor

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Kanker pankreas merupakan jenis tumor ganas yang sangat mematikan. Penderita kanker pankreas umumnya ditangani dengan kemoradioterapi dan obat gempitabin, namun masih belum memberikan hasil klinis yang baik. Penelitian ini bertujuan menentukan perbandingan potensi senyawa bahan alam brusein D sebagai inhibitor protein transkripsi NFκB sel kanker pankreas berdasarkan energi bebas Gibbs (ΔG), tetapan inhibisi, interaksi hidrogen secara fleksibel dan *rigid docking*. Berdasarkan hasil analisis *docking*, menunjukkan bahwa *docking* secara fleksibel memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan *rigid*. Selain itu, senyawa brusein D memberikan potensi inhibisi yang lebih baik dibandingkan standar gempitabin.

Kata kunci: brusein D, docking, kanker pankreas, protein NFκB

ABSTRACT

Pancreatic cancer is a malignant tumor types are particularly deadly. Patients with pancreatic cancer are generally treated with chemoradiotherapy and gemcitabine, but still provide a good clinical outcome. This study aims to determine the ratio of the potential of bruceine D as inhibitors of protein NFκB transcription of pancreatic cancer cells by the Gibbs free energy (ΔG), inhibition constants, hydrogen interactions are flexible and rigid docking. Based on the analysis docking, docking flexibly deliver better results than rigid. Additionally, bruceine D provides the potential for better inhibition than gemcitabine.

Keywords : bruceine D, docking, pancreatic cancer, NFκB protein

PENDAHULUAN

Salah satu jenis kanker paling mematikan di dunia adalah kanker pankreas. Kasus kanker pankreas terus meningkat dalam 2 dekade terakhir dengan tingkat morbiditas dan mortalitas penderita yang sangat tinggi [1]. Penderita kanker pankreas yang dapat bertahan hidup selama 5 tahun berjumlah kurang dari 5% [2]. Hal ini terjadi karena proliferasi atau pembelahan sel yang bermutasi secara tidak terkendali sehingga sel kanker mengurangi proses terjadinya apoptosis [3] (proses bunuh diri pada sel) sangat penting karena berguna untuk menghilangkan sel-sel abnormal atau sel kanker [4]. Oleh karena itu, protein yang berperan dalam proses pembelahan dan metabolisme sel kanker (protein antiapoptosis) harus dihambat [5]. Salah satu jenis protein antiapoptosis yang akan dihambat pada penelitian ini adalah NF κ B [6].

Protein NF κ B merupakan jenis protein yang berperan sebagai faktor transkripsi pada sel kanker payudara, kolon, prostat dan kanker pankreas. Aktivasi protein NF κ B terkait dengan tahap inisiasi dan perkembangan gen sel kanker yang terlibat pada pertumbuhan sel, proliferasi, antiapoptosis, angiogenesis, dan metastasis [7]. Beberapa jenis protein NF κ B yang terdapat pada mamalia adalah NF κ B1 (p50), dan NF κ B2 (p52). Protein tersebut berbentuk homodimer maupun heterodimer [8]. Beberapa faktor yang dapat mengaktifkan dari protein NF κ B adalah ROS, TNF α , interleukin (IL)-1 β , bakteri lipopolisakarida, virus DNA beruntai ganda, dan radiasi⁷. Protein NF κ B bersifat spesifik hanya terdapat jaringan yang terkena sel kanker dan tidak terdapat pada jaringan sel normal [9].

Gemcitabin merupakan analog dari pirimidin yang bekerja merusak susunan dari asam nukleat sehingga menghambat proses pembelahan sel. Penghambatan tersebut mendorong sel untuk mengaktifkan mekanisme apoptosis atau sel melakukan bunuh diri [10]. Namun, dalam dosis yang tinggi, obat ini dapat menyebabkan keracunan pada hati dan ginjal, anemia, dan trombositopenia [11]. Oleh karena itu, telah banyak diteliti obat kanker yang berbasis bahan alam. Obat kanker yang banyak dikembangkan saat ini berasal dari bahan alam yang digabung dengan kemoterapi dan radioterapi konvensional [6].

Brucea javanica (L.) Merr. atau biasa dikenal dengan nama buah makasar merupakan

tumbuhan obat yang biasa digunakan sebagai antimalaria, antipiretik, dan efek homeostatis [12]. Kandungan senyawa aktif dari buah ini adalah brusein D yang telah diketahui memiliki aktifitas antiproliferasi pada sel kanker. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak etanol dari tanaman ini dapat menghambat proliferasi sel adenokarsinoma pankreas manusia dan menyebabkan apoptosis secara *in vitro* [13]. Brusein D menghambat protein p38 atau dikenal juga sebagai MAPK dan mengaktifkan jalur sinyal apoptosis pada sel kanker pankreas [14].

Analisis penghambatan menggunakan metode komputasi atau *in silico* yang merupakan metode *docking* atau penambatan ligan pada suatu protein. Metode ini lazim digunakan dalam tahap pencarian suatu kandidat molekul obat, karena metode ini sangat cepat, ekonomis, andal, dan ramah lingkungan [15]. Pada penelitian ini bertujuan menentukan potensi inhibisi dari Brusein D terhadap protein NF κ B berdasarkan parameter energi bebas Gibbs, tetapan inhibisi, serta interaksi antara protein dan senyawa ligan kandidat obat.

METODE PENELITIAN

Bahan: Perangkat lunak Autodock Tools 1.5.6, Autogrid 4.2, Autodock 4.2, Pymol 1.7.

Alat: Seperangkat komputer dengan *chip processor* AMD A10-6800K *quadcore* 4.1GHz, *random access memory* (RAM) 8 gigabit, dan *video graphics array* AMD Radeon HD 8670D, ditunjang dengan akses internet 4G LTE menggunakan modem ZTE mf825a untuk mengunduh data-data protein dan substrat.

Metode

Preparasi Fail Protein dan Ligan

Protein-protein yang berperan dalam pertumbuhan dan pembelahan sel kanker (antiapoptosis), ditelusuri pada situs *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) dengan menggunakan perangkat komputer yang terhubung ke internet. Protein yang ditelusuri adalah protein transkripsi (NF κ B1, NF κ B2) [6]. Fail protein tersebut diunduh dan dikumpulkan dengan format .pdb.

Ligan yang akan digunakan untuk menginhibisi protein antiapoptosis juga ditelusuri dan dikumpulkan dalam format .pdb. Ligan-ligan tersebut brusein D dan gemcitabin.

Optimasi Grid

Protein .pdb diolah menggunakan Perangkat Lunak Autodock Tools 1.5.6 dengan melakukan *read molecule*. Protein disimpan dengan ekstensi .pdbqt. Kemudian ligan dibuka dengan *input ligand*, diatur agar sehingga memiliki torsi yang bebas dan disimpan juga dengan ekstensi .pdbqt. Ukuran *grid* ditentukan pada setiap protein dengan nilai x, y, z yang berbeda-beda berdasarkan hasil optimasi. Jarak antar *grid* juga ditetapkan berbeda-beda pada setiap protein dengan satuan angstrom (Å). *Grid* dibuat sebesar mungkin sampai tepat menutupi seluruh sisi aktif permukaan protein. Fail *grid* disimpan dalam bentuk *grid.gpf*.

Docking

Autogrid merupakan bagian dari proses *docking* untuk menentukan area interaksi antara protein dan ligan. *Grid* yang digunakan merupakan hasil dari proses optimasi sebelumnya. Setelah ukuran *grid* disesuaikan dengan *grid optimum*, disimpan dalam bentuk *grid.gpf*. Setelah itu, *Autogrid 4.2* diolah menggunakan terminal ubuntu pada direktori fail tersebut.

Prosedur *docking* secara fleksibel pada umumnya sama dengan *docking* secara *rigid*. Perbedaannya hanya terdapat pada ikatan σ , pada kondisi *rigid* ikatan σ dibuat tidak dapat berotasi. *Docking* dilakukan pada terminal Ubuntu menggunakan Autodock 4.2 sehingga menghasilkan fail *docking.dlg*. Fail *docking.dlg* dianalisis menggunakan Autodock Tools 1.5.6 untuk mengetahui nilai ΔG . Fail tersebut kemudian disimpan dalam bentuk kompleks untuk divisualisasikan menggunakan Pymol 1.7.

Visualisasi Fail Docking

Fail keluaran *docking* dengan ekstensi .pdbqt divisualisasikan menggunakan Pymol 1.7 untuk melihat tapak pengikatan, jumlah interaksi hidrogen, dan jarak antar atom yang berikatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

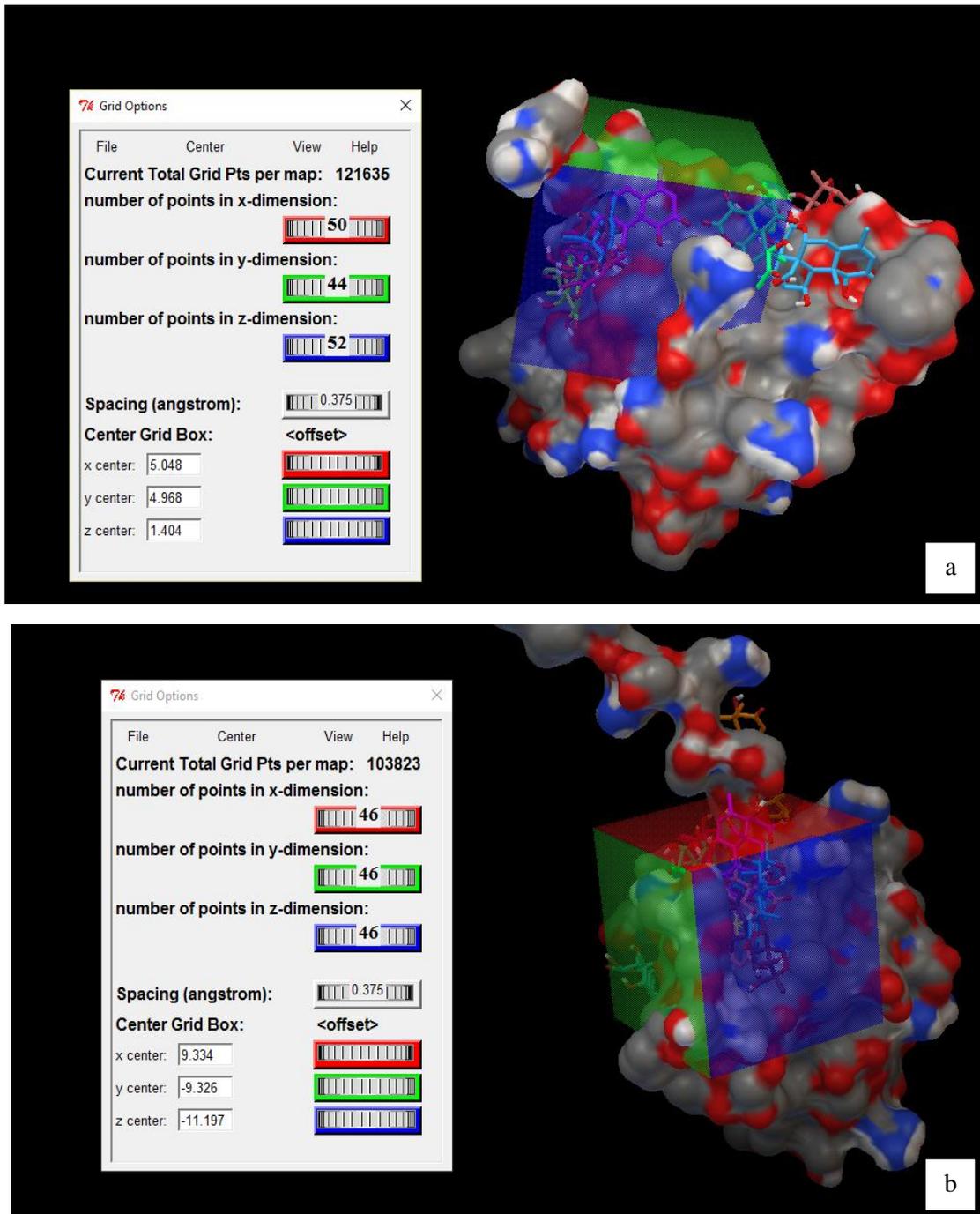
Pertumbuhan sel kanker disebabkan protein-protein yang meregulasi kelangsungan hidup sel mengalami malafungsi sehingga sel tersebut terus tumbuh secara abnormal. Protein tersebut harus diinaktivasi dengan cara inhibisi melalui tapak aktifnya dengan menggunakan ligan obat. Oleh karena itu, pencarian obat baru masih terus dilakukan

untuk memberikan tingkat harapan hidup yang lebih tinggi. Kandidat obat harus mengandung ligan yang dapat menghambat terjadinya antiapoptosis sehingga menghambat terjadinya proliferasi, diferensiasi, apoptosis, dan metastasis [3]. Salah satu ligan yang dapat menghambat protein antiapoptosis adalah senyawa ligan bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan yang baik dan tanpa efek samping.

Pencarian kandidat obat tersebut dapat dilakukan secara *in silico* dengan metode *docking*. Simulasi *docking* ini melibatkan beberapa protein antiapoptosis sel kanker pankreas serta ligan-ligan yang berasal dari senyawa bahan alam. Protein dan ligan tersebut diinteraksikan untuk menentukan senyawa bahan alam terbaik yang dapat menghambat protein antiapoptosis berdasarkan beberapa parameter seperti energi bebas Gibbs (ΔG), tetapan inhibisi, dan interaksi hidrogen. Interaksi kemudian dibandingkan dengan hasil *docking* antara protein antiapoptosis dan standar gemcitabin.

Tapak Aktif Protein

Sebelum dilakukan *docking*, terlebih dahulu ditentukan daerah pada protein yang akan diinhibisi atau *grid*. *Grid* merupakan daerah tempat terjadinya interaksi pada proses *docking*, yang berbentuk kubus atau balok dengan sebuah titik pusat x, y, z dan dimensi x, y, z (Gambar 1). Pada proses *docking*, *grid* harus diarahkan pada tapak aktif protein. Biasanya tapak aktif protein berupa seperti lubang atau *cave* yang akan diisi oleh ligan. Pada protein biasanya terdapat lebih dari 1 lubang. Oleh karena itu, ketertarikan ligan terhadap lubang-lubang protein tersebut diuji secara acak menggunakan algoritma, untuk mengetahui daerah tapak aktif protein. Optimasi *grid* seperti ini juga biasa dikenal dengan uji cavity [16]. Untuk mendapatkan *grid* pada lubang yang tepat, protein diinteraksikan dengan ligan menggunakan dimensi *grid* yang besarnya tepat menutupi seluruh permukaan protein target. Parameter algoritma yang digunakan adalah *Lamarckian Genetic Algorithm* [17]. Total konformasi terbaik yang ditampilkan oleh Autodock Tools adalah 10 interaksi ligan. Daerah dengan banyak ligan menempel diduga merupakan tapak aktif protein yang selanjutnya akan digunakan untuk *docking*.



Gambar 1. Optimasi *grid* tapak aktif protein NFκB1 (a) dan NFκB2 (b).

Tabel 1 menunjukkan hasil dari optimasi *grid*. Hasil optimasi *grid* tapak aktif protein tersebut kemudian digunakan untuk *docking* secara fleksibel dan *rigid*.

Interaksi Protein-Ligan

Docking atau penambatan protein-ligan dilakukan untuk mencari interaksi terbaik antara protein-ligan dengan parameter tertentu seperti energi bebas Gibbs (ΔG), tetapan inhibisi, dan interaksi hidrogen. *Docking* dilakukan 2 macam perlakuan terhadap ligan, yaitu *rigid* dan fleksibel. Perlakuan ini

bertujuan untuk membandingkan interaksi yang lebih baik antara ligan *rigid* dan fleksibel. *Docking* secara *rigid* berbasis pada teori enzim Emil Fischer. Substrat akan menginduksi enzim tepat pada tapak aktif untuk mencapai reaksi. *Docking* secara fleksibel berbasis pada teori enzim *Induced Fit*, teori ini mengasumsikan bahwa substrat berperan dalam menentukan bentuk akhir dari enzim dan sebagian dari enzim tersebut bersifat fleksibel. Hal ini menjelaskan mengenai senyawa tertentu dapat mengikat enzim, tetapi tidak bereaksi karena enzim tersebut terdistorsi. Senyawa

tersebut mungkin terlalu kecil untuk dapat bereaksi dengan substrat yang tepat. menginduksi enzim, sehingga enzim hanya

Tabel 1. Grid tapak aktif protein transkripsiNFκB.

Protein	Titik Pusat Tapak aktif (Å)			Dimensi Tapak aktif (Å)		
	x	y	z	x	Y	Z
NFκB1	5.048	4.968	1.404	50	44	52
NFκB2	9.334	-9.326	-11.197	46	46	46

Interaksi Protein-Ligan secara Fleksibel dan Rigid

Docking secara fleksibel memungkinkan ligan berotasi bebas pada rantai tunggalnya sehingga ligan memiliki banyak konformasi. Ikatan σ yang berbentuk silinder simetris memungkinkan rotasi antar karbon-karbon dalam molekul rantai terbuka. Pada dasarnya prosedur *docking* protein-ligan secara fleksibel sama dengan saat menentukan tapak aktif protein, akan tetapi menggunakan *grid* yang lebih spesifik dan terarah pada tapak aktif protein.

Docking secara *rigid* pada umumnya sama dengan *docking* secara fleksibel, perbedaannya hanya terdapat pada ikatan σ ligan. Pada *docking* secara *rigid*, ikatan σ dibuat menjadi kaku sehingga tidak dapat berotasi.

Fail protein diolah menggunakan Autodock Tools, kemudian protein dibersihkan dari molekul-molekul air dan dilakukan penambahan hidrogen. Penambahan atom hidrogen dilakukan karena terdapat kemungkinan hilangnya atom hidrogen pada

saat kristalisasi yang dapat memengaruhi interaksi.

Setelah *grid* terbentuk, dilakukan *autogrid* menggunakan Autogrid 4.2 dan *docking* menggunakan Autodock 4.2 melalui Terminal Ubuntu. Kemudian akan diperoleh nilai ΔG paling rendah atau negatif. Kriteria $\Delta G < 0$ pada suhu dan tekanan konstan, memiliki arti bahwa reaksi kimia tersebut bersifat spontan dengan penurunan energi bebas Gibbs. Jika pada hasil reaksi ΔG menurun, maka reaksi memiliki kecenderungan spontan untuk mengkonversi reaktan menjadi produk.

Indikator proses *docking* yang baik dapat dilihat dengan membandingkan nilai energi bebas Gibbs (ΔG), tetapan inhibisi, dan jumlah interaksi hidrogen terhadap standar inhibitor. Ikatan pembentukan kompleks yang kuat ditandai dengan nilai ΔG yang rendah, tetapan inhibisi rendah, dan banyaknya jumlah interaksi hidrogen. Berdasarkan nilai ΔG tersebut menggunakan persamaan Gibbs maka akan diperoleh nilai tetapan inhibisi (K_i) [18].

$$K = 1/K_i \dots \dots \dots \{i\}$$

$$\Delta G = -RT \ln K \dots \dots \dots \{ii\}$$

$$\Delta G = -RT \ln 1/K_i \dots \dots \dots \{i\} \text{ dan } \{ii\}$$

$$\Delta G = RT \ln K_i \dots \dots \dots \{i\} \text{ dan } \{ii\}$$

$$K_i = e^{\frac{\Delta G}{RT}} \dots \dots \dots \{i\} \text{ dan } \{ii\}$$

Hasil analisis energi bebas Gibbs , tetapan inhibisi rendah, dan banyaknya jumlah interaksi

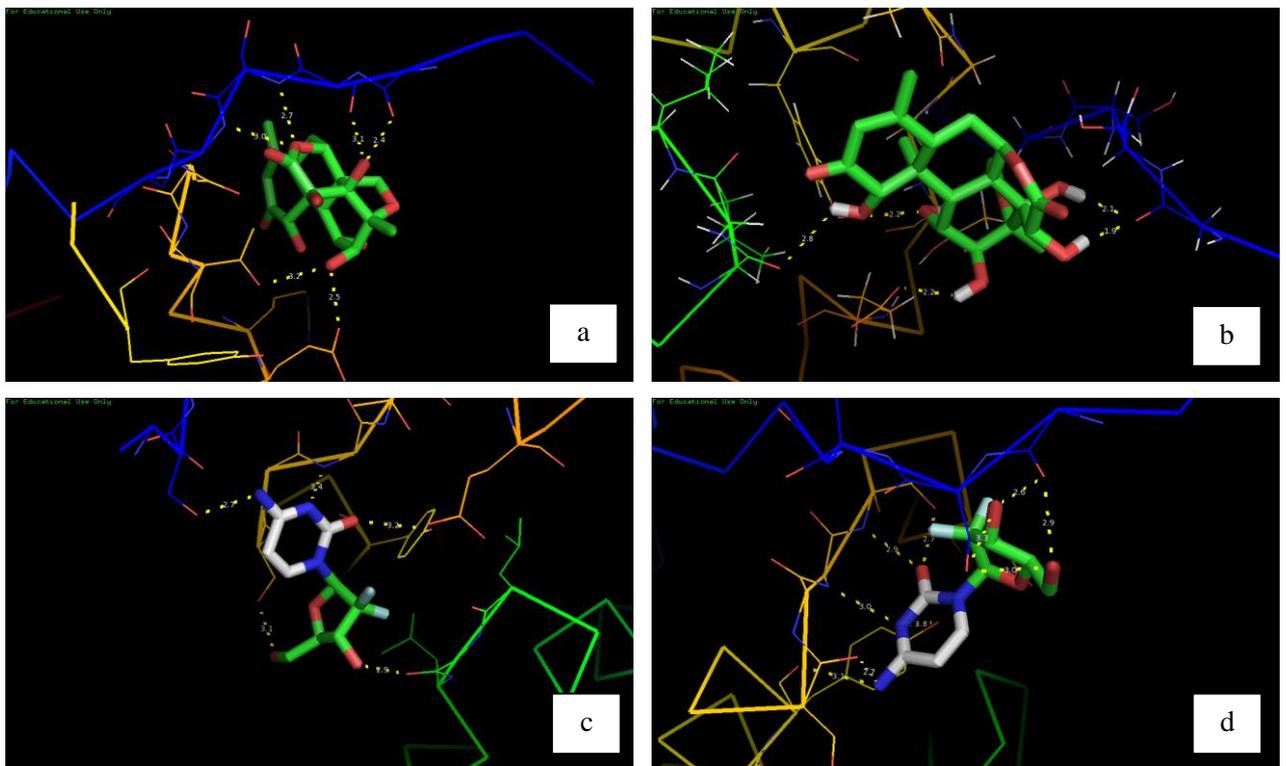
hidrogen dapat dilihat pada Tabel 2. Jika dibandingkan antara *docking* secara *rigid* dan

fleksibel, maka *docking* secara fleksibel memberikan lebih banyak kemungkinan interaksi, karena pada *docking* secara *rigid*, ikatan antara karbon-karbon sp^3 dibuat kaku sehingga tidak dapat berputar. Ligan-ligan yang masuk ke dalam lubang protein membutuhkan penyesuaian dengan mengubah konformasi ligan agar ligan bisa menginhibisi dengan baik. Senyawa ligan bahan alam memiliki struktur yang cukup besar, rerata terdiri lebih dari 20 karbon sehingga cukup sulit bagi ligan tersebut

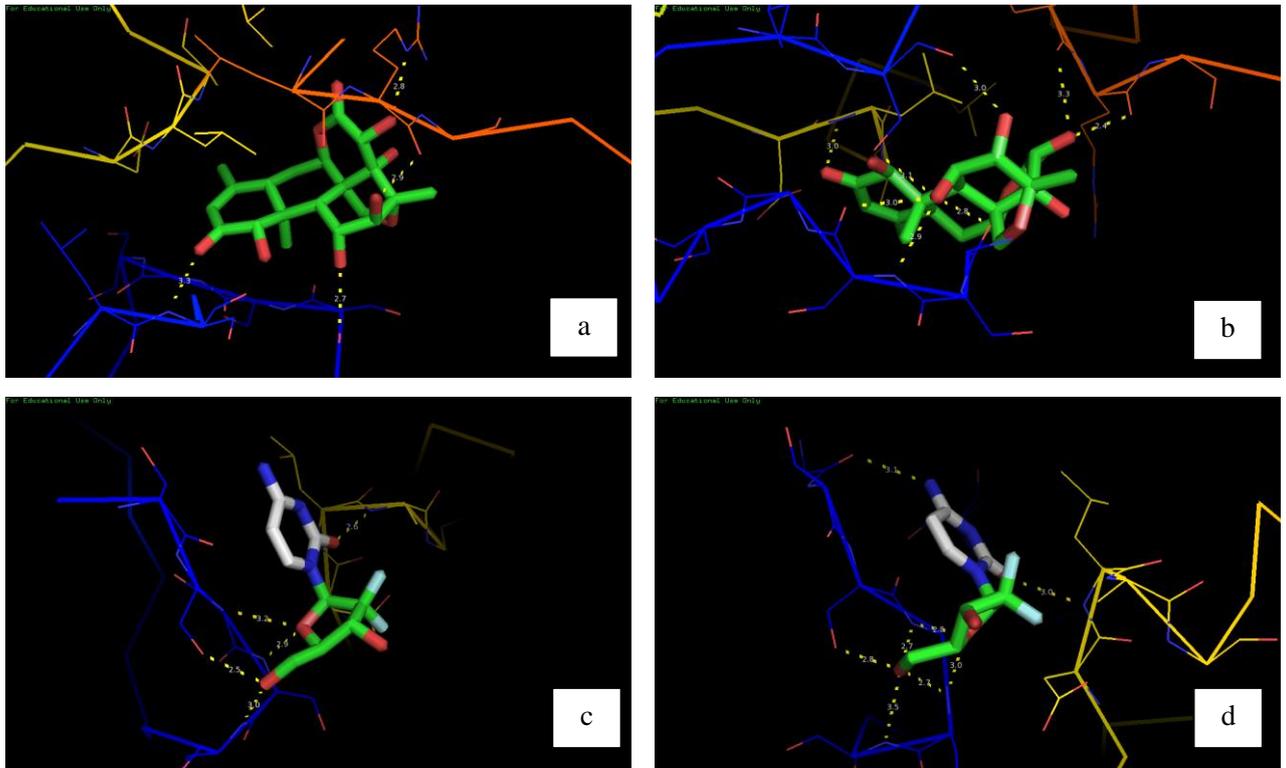
untuk masuk ke dalam protein jika tidak melakukan penyesuaian. Kesulitan tersebut membuat interaksi protein-ligan menjadi kurang spontan dibandingkan dengan *docking* secara fleksibel, terlihat dari nilai ΔG yang menurun pada hampir seluruh interaksi protein-ligan secara *rigid*. Jumlah interaksi hidrogen juga mengalami penurunan akibat sulitnya ligan berinteraksi dengan protein (Gambar 2 dan Gambar 3).

Tabel 2. Hasil *Docking* protein-ligan secara fleksibel dan *rigid*.

Protein	Ligan	Fleksibel			<i>Rigid</i>		
		ΔG (kcal/mol)	$K_{Inhibisi}$	Σ Interaksi Hidrogen	ΔG (kcal/mol)	$K_{Inhibisi}$	Σ Interaksi Hidrogen
NF κ B1	Brusein D	-5.49	94.05	5	-4.55	460.05	4
	Gemcitabin	-3.75	1776.50	6	-3.03	5993.05	4
NF κ B2	Brusein D	-6.14	31.38	6	-5.93	44.73	4
	Gemcitabin	-5.33	123.23	7	-3.54	2532.73	4



Gambar 2. Visualisasi interaksi *docking* protein NF κ B1 dengan ligan, brusein D *rigid* (a), brusein D fleksibel (b), gemcitabin *rigid* (c), gemcitabin fleksibel (d).



Gambar 3. Visualisasi interaksi *docking* protein NFκB2 dengan ligan, brusein D *rigid* (a), brusein D fleksibel (b), gemsitabin *rigid* (c), gemsitabin fleksibel (d).

SIMPULAN

Berdasarkan pada hasil analisis *docking*, *docking* secara fleksibel memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan *rigid*. Brusein D memberikan potensi inhibisi lebih baik

dibandingkan dengan gemsitabin berdasarkan nilai energi bebas Gibbs, tetapan inhibisi dan interaksi ikatan hidrogen antara protein dan ligan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Nakamura T, Masuda K, Harada S, Akioka K, Sako H. 2013. Pancreatic cancer: Slow progression in the early stages. *Int JSurgery Case Rep.* 4:693-696.
- [2] Zhao G, Deng S, Zhu S, Wang B, Li X, Liu Y, *et al.* 2014. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer demonstrate active epithelial-mesenchymal transition profile, regulated by miR-217-SIRT1 pathway. *Cancer Lett.* 355:184-191.
- [3] Pratheeshkumar P, Sreekala C, Budhraja A, Ding S, Son Y, Wang X, *et al.* 2012. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anti-Cancer Agents in MedChem.* 12:1-26.
- [4] Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T. 2012. Cancer chemoprevention through the introduction of apoptosis by natural compound. *Journal of Biophysical Chemistry.* 2:156-173
- [5] Yan C, Siegel D, Newsome J, Chiloux A, Moody CJ, Ross D. 2012. Antitumor indolequinones induced apoptosis in human pancreatic cancer cells via inhibition of thioredoxin reductase and activation of redox signaling. *Molecular Pharmacology.* 81(3):401-410.
- [6] Lin L, Leung PS. 2014. Use herbal medicines and natural product: an alternative approach to overcoming the apoptotic resistance of pancreatic cancer. *Int JBiochem & Cell Bio.* 53:224-236.

- [7] Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. 2010. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev.*3:23-34.
- [8] Carbone C, Melisi D. 2012. NF-kappaB as a target for pancreatic cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.*16(2):S1-10.
- [9] Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. 1999. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 5:119-127.
- [10] Cerqueira NMFS, Fernandes PA, Ramos MJ. 2007. Understanding ribonucleotide reductase inactivation by gemcitabine. *Chem Eur J.*13:8507-8515.
- [11] Moysan E, Bastiat G, Benoit JP. 2013. Gemcitabine versus modified gemcitabine: A review of several promising chemical modifications. *J Am Chem Soc.* 10:430-444.
- [12] Wagih ME, Alam G, Wiryowidagdo, Attia K. 2008. Improved production of the indole alkaloid canthin-6-one from cell suspension culture of *Brucea javanica*(L.) Merr. *Indian Journal of Science and Technology.* 1(7):1-6.
- [13] Lau ST, Lin ZX, Zhao M, Leung PS. 2008. *Brucea javanica* fruit induces cytotoxicity and apoptosis in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Phytother. Res.* 22:477-486.
- [14] Lau ST, Lin ZX, Liao Y, Zhao M, Cheng HK, Leung PS. 2009. Brucein D induces apoptosis in pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1 through the activation of p38-mitogen activated protein kinase. *Cancer Letters.* 281:42-52.
- [15] Ördög R dan Grolmusz V. 2008. Evaluating genetic algorithms in protein-ligand docking. *Lecture Notes in Comp Sci.* 4983:402-413.
- [16] Oliveira SHP, Ferraz FAN, Honorato RV, Xavier-Neto J, Sobreira TJP, Oliveira PSL. 2014. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. *BMC Bioinformatics.* 15:197-204.
- [17] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 30(16):2785-2791.
- [18] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem.* 19(14):1639-1662.