

Simulasi Penambatan Isoflavon pada Reseptor Estrogen β sebagai Pengobatan Kanker Payudara Secara In Silico

Budi Mulyati
Universitas Nurtanio

b.mulyati@unnur.ac.id

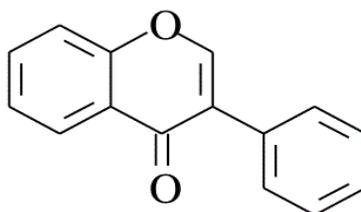
Abstrak Reseptor estrogen- β (ER- β) merupakan faktor penting dalam penghambatan dan invasi terhadap sel kanker payudara. Reseptor estrogen- β yang terkompleks dengan genistein seringkali dijadikan model target terhadap aksi obat. Kedelai mengandung isoflavon, salah satu bahan pangan yang terbuat dari kedelai adalah tempe. Pada tempe terdapat empat jenis isoflavon yaitu *daidzein*, *glisitein*, *genistein* dan faktor II (6,7,4- *trihidroksi* isoflavon). Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan urutan ligan yang berinteraksi lebih kuat terhadap RE α serta menentukan gugus fungsi yang berperan aktif dan jenis interaksi yang terjadi antara ligan dan reseptor. Penelitian diawali dengan optimasi struktur RE β (PDB kode 1QKM), kemudian disimulasikan *docking* dengan ligan menggunakan *autodock Vina*, dan ditentukan energi afinitasnya. Ligan yang digunakan pada penelitian ini adalah faktor II, daidzein, genistein, glisitein dengan estrogen sebagai pembanding. Hasil penelitian ini menunjukkan energi afinitas RE β berturut-turut adalah -6,7 kkal/mol; -6,5 kkal/mol; -6,3 kkal/mol dan -3,2 kkal/mol.

1. Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu masalah Kesehatan terbesar di Indonesia dan menjadi penyebab kematian tertinggi kedua setelah penyakit kardiovaskuler. Data *Global Burden of Cancer Study*(Globocan) dari *World Health Organization* (WHO) mencatat total kasus kanker di Indonesia pada tahun 2020 mencapai 396.914 kasus dan total kematian sebesar 234.511 kasus. Kanker payudara memiliki jumlah kasus baru tertinggi di Indonesia yaitu sebesar 65.858 kasus atau 16,6% [1].

Pada tubuh manusia terdapat dua jenis estrogen reseptor yaitu reseptor estrogen α dan reseptor estrogen β . Keduanya terdistribusi pada sel yang berbeda, mengatur gen yang terpisah yang menyebabkan memiliki efek yang berbeda. Sebagai target terapeutik, ER- α merupakan faktor yang penting untuk memprediksi prognosis kanker payudara. Sedangkan ER- β dapat menghambat proliferasi dan invasi sel kanker payudara [2].

Isoflavon adalah salah satu jenis senyawa metabolit sekunder yang termasuk ke dalam senyawa flavonoid. Isoflavon menunjukkan aktivitas biologi yang penting diantaranya dapat menghambat perkembangan sel kanker payudara, kanker rahim, dan sel kanker hati. Isoflavon dapat disintesis oleh tanaman namun tidak dapat disintesis oleh mikroorganisme. Tanaman yang banyak mengandung isoflavon, salah satunya adalah golongan Leguminoceae antara lain kacang kedelai dan kacang tunggak tetapi banyak juga terdapat pada semanggi, biji wijen, bunga matahari, bengkuang, jeruk dan tomat [3]. Struktur umum senyawa isoflavon dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur umum senyawa isoflavon

Pada kedelai mengalami berbagai perubahan pada proses pembuatan tempe baik oleh proses fisik maupun proses enzimatik oleh adanya aktivitas mikroorganisme. Keterlibatan mikroorganismen pada proses pembuatan tempe terutama terjadi pada proses perendaman oleh bakteri-bakteri pembentuk asam dan proses fermentasi oleh kapang khususnya *Rhizopus oligosporus*[4].

Sebagai akibat perubahan-perubahan tersebut tempe menjadi lebih enak, lebih bergizi, dan lebih mudah dicerna. Salah satu faktor penting dalam perubahan tersebut adalah terbebasnya senyawa-senyawa isoflavon dalam bentuk bebas dari aglikonnya, dan teristimewanya hadirnya Faktor-II (6,7,4'-trihidroksi isoflavon), yang terdapat pada tempe tetapi tidak terdapat pada kedelai, ternyata berpotensi tinggi (dibanding dengan jenis isoflavon yang lainnya) sebagai antioksidan [5], antihemolitik [6] penurun tekanan darah, anti kanker dan sebagainya [7].

Studi *in silico* memberikan keuntungan dalam penemuan obat baru secara efisien dengan menggunakan metode pemodelan yakni simulasi dengan bantuan teknologi komputasi [8]. Studi *in silico* membutuhkan protokol yang tervalidasi agar dapat mengidentifikasi senyawa-senyawa yang dapat menjadi ligan bagi reseptor. Protokol penapisan RE sudah banyak dikembangkan, salah satunya adalah protokol yang dikembangkan oleh [9].

2. Metodologi

Perangkat Keras : Seperangkat komputer dengan chip processor Core™ i5-3230M2 Cores, 4 Threads@2.6GHz, 4.00 GB DDR3 1600 MHz random access memory, 2GB DDR3 Radeon HD 8670M video graphics array, ditunjang dengan akses internet untuk mengunduh data-data protein.

Perangkat Lunak yang digunakan dalam penelitian ini adalah untuk keperluan simulasi yaitu ACD/Chemsketch digunakan untuk membuat struktur dua dimensi dan tiga dimensi seluruh ligan. Avogadro digunakan untuk visualisasi struktur tiga dimensi ligan dari hasil ACD/ChemSketch maupun Gaussian-09. Untuk keperluan visualisasi adalah VMD digunakan untuk visualisasi dan preparasi input yang akan digunakan untuk simulasi pada NAMD. VMD juga digunakan untuk menganalisa output dari hasil perhitungan simulasi NAMD. NAMD digunakan untuk optimasi struktur protein. Autodock Vina digunakan untuk simulasi *docking* Reseptor Estrogen β dengan seluruh ligan. Ligplot digunakan untuk visualisasi hasil proses *docking* [10].

Ligan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Genistein, Daidzein, Glisitein, dan Faktor 2, ligan Estrogen digunakan sebagai pembanding. Struktur ligan digambar menggunakan ACD/Chemsketch kemudian dibuat tampilan tiga dimensi. Input dibuat menggunakan Avogadro untuk selanjutnya dilakukan simulasi optimasi geometri menggunakan Gaussian-09. Optimasi geometri diset pada temperatur 310 K dengan basis 6-31 G (d) dan teori B3LYP.

Untuk optimasi struktur reseptor Estrogen β , mengambil data dari Bank Data Protein (PDB) dengan kode 1QKM. Struktur divisualisasi menggunakan VMD kemudian dihilangkan ligannya. Struktur RE β disolvasi kemudian dinetralisasi. Preparasi RE β juga dilakukan menggunakan VMD. Struktur RE β dioptimasi menggunakan NAMD. Optimasi diset pada temperature 310 K dan dilakukan dengan metode *Periodic Boundary Condition* (PBC), yaitu kondisi dimana batas molekul air sebagai pelarut disusun berbentuk kotak dan memiliki keberulangan yang kontinu serta dianggap seolah-olah tanpa batas ukuran. Hasil optimasi struktur RE β dianalisis menggunakan VMD.

Simulasi Penambatan Reseptor Estrogen β dengan ligan Isoflavon

Program Autodock Vina digunakan untuk menggabungkan setiap ligan ke *ligand-binding domain* ER β . Autodock dapat menggabungkan molekul ligan ke molekul protein globular yang rigid berdasarkan algoritma Lamarckian genetic. Model ini mengkombinasikan kecepatan evaluasi energi menggunakan prekalkulasi kisi (grid) energi afinitas atomik setiap tipe atom dalam molekul reseptor dengan variasi algoritma pencarian untuk menemukan posisi pengikatan yang sesuai untuk ligan dimana pada penelitian ini digunakan *genetic algorithm* (GA).

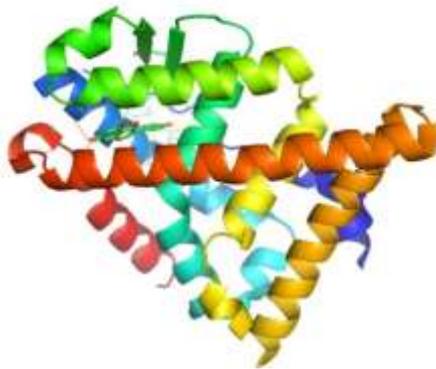
Model estrogen reseptor digunakan sebagai molekul target. Program *Autodock Vina* 4.0 digunakan untuk mengkalkulasikan muatan parsial atom dalam molekul target. Kisi kubus (*grid box*) (18 x 18 x 18) dari interaksi karbon, hidrogen dan oksigen. Dilakukan penambahan hidrogen polar pada RE α

menggunakan *autodock Vina*. Proses *docking* RE α -ligan juga dilakukan menggunakan *Autodock Vina*. RE β yang digunakan adalah RE β dalam bentuk kristalnya sebelum dioptimasi dan RE β dalam bentuk solvasi setelah optimasi. Hasil *docking* dianalisis menggunakan *Pymol*. Untuk menentukan residu asam amino yang aktif yang berikatan langsung dengan ligan maka digunakan software *ligplot* dengan memasukkan data PDB hasil dari *autodock Vina* [11].

3. Hasil dan Pembahasan

Optimasi Reseptor Estrogen β

Struktur protein RE β diambil dari bank data protein dengan kode 1QKM. Struktur ini digunakan karena memiliki rantai asam amino yang paling panjang yaitu 203 asam amino tanpa ada asam amino yang putus maupun asam amino yang belum diidentifikasi. Struktur RE β ini merupakan struktur kristal berupa monomer dengan satu rantai. RE β ini merupakan struktur kristal berupa monomer dengan satu rantai. RE β yang terikat kompleks dengan genestein ini dapat dilihat padagambar 2 genestein merupakan senyawa yang mampu mengaktifkan aktivitas estrogen pada reseptornya. Namun selanjutnya genestein dihilangkan keberadaannya.



Gambar 2. Reseptor Estrogen β

Proses penambatanmolekul dilakukan pada RE β yang sudah dioptimasi dengan ligan yang sudah dioptimasi pula. Pada proses *docking*, protein reseptor diasumsikan sebagai molekul yang kaku sedangkan ligan diasumsikan sebagai molekul yang memiliki beberapa derajat kebebasan, terutama dalam sudut torsional, karena beberapa parameter lainnya seperti panjang ikatan dan sudut ikatan memiliki nilai konstan untuk konformasi molekul yang berbeda[13]. Oleh karena itu hasil yang didapat setelah tahap penambatan molekul adalah berbagai energi afinitas interaksi ligan yang dapat terikat pada domain pengikatan ligan RE β . Data hasil penambatan RE β dengan berbagai kemungkinan konformasi ligan yang terbentuk dapat dilihat sebagai berikut.

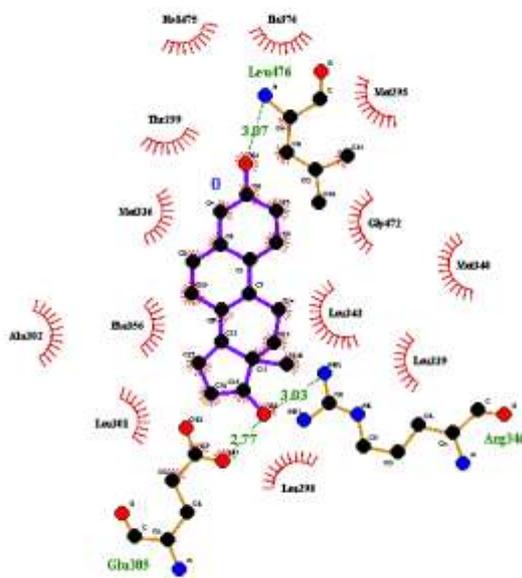
Tabel 1. Energi Afinitas Ligan terhadap Reseptor Estrogen β serta Persentasi Interaksi

Nama Ligan	Energi Afinitas	Persentasi Interaksi
Estrogen	-6,8 Kkal/mol	100 %
Faktor 2	-6,7 Kkal/mol	98,53 %
Genestein	-6,3 Kkal/mol	92,65 %
Glisitein	-3,2 Kkal/mol	47,05 %
Daidzein	-6,5 Kkal/mol	95,59 %

Pada uji transaktivasi secara eksperimen oleh Kuiper et al., (1998) [12] estrogen dan berbagai fitoestrogen dicampurkan ke dalam larutan protein ER β , kemudian dilihat inhibisi fitoestrogen tersebut dalam interaksinya terhadap ER β . Sedangkan urutan potensi estrogenik fitoestrogen pada RE β adalah sebagai berikut: Estradiol >> genistein = coumestrol > zearalenone > daidzein > biochanin A = apigenin = kaempferol = naringenin > phloretin = quercetin = ipriflavone = formonetin = chrysin. Dari urutan potensi estrogenik yang tidak sama menunjukkan bahwa hasil pemodelan struktur reseptor-ligan secara komputasi tidak sejalan dengan hasil eksperimen yang dilakukan oleh Kuiper et al, namun perbedaannya hanya terletak pada urutan daidzein dan genestein, hal ini dikarenakan adanya gugus OH yang lebih elektronegatif pada gugus aromatik pada ligan daidzein menyebabkan adanya ikatan hidrogen antara ligan dengan reseptor estrogen lebih stabil, dan menyebabkan energi afinitas antara daidzein dan reseptor estrogen menjadi rendah. Walaupun terdapat perbedaan urutan potensi estrogenik antara daidzein dan genestein, namun perbedaannya hanya 1,49 % pada reseptor estrogen α dan 2,94% pada reseptor estrogen β , sehingga perbedaannya tidak terlalu signifikan. Sedangkan untuk ligan faktor 2, kakkatin, 6,4 - dihidroksi - 7 - metoksiisoflavon dan glisitein belum ada data eksperimen. Dibandingkan dengan isoflavon lain, faktor 2 memiliki afinitas yang paling tinggi hal ini dikarenakan struktur faktor 2 mempunyai tiga gugus hidroksil pada posisi C-6, C-7 dan C-4 sehingga probabilitas untuk berinteraksi secara ikatan hidrogen tinggi. Ikatan hidrogen penting dalam pengikatan ligan dan reseptor. Struktur dan orientasi docking dari interaksi secara ikatan hidrogen dari faktor 2 menyebabkan banyak terbentuknya ikatan hidrogen antara faktor 2 dan reseptor estrogen.

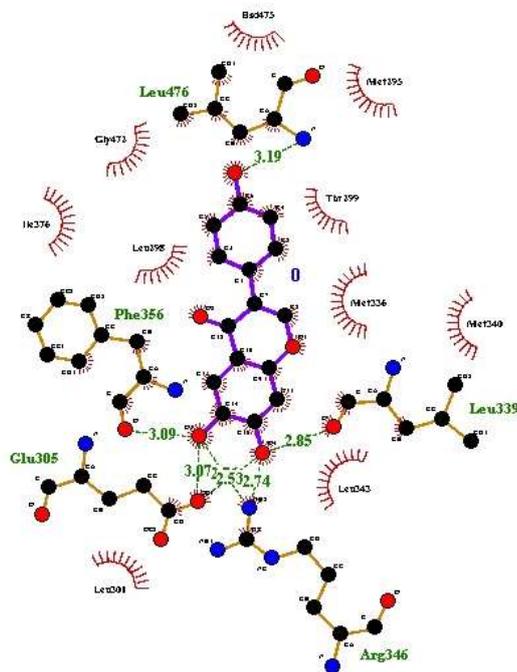
4. Gugus fungsi yang berperan pada Reseptor Estrogen β

Dari tabel dapat diketahui bahwa energi afinitas estrogen yang paling rendah dibandingkan ligan lain. Hal ini disebabkan karena estrogen mempunyai gugus fenol pada posisi C-3 dalam cincin aromatik A, inti hidrokarbon yang relatif kaku dan gugus fungsi alkohol pada posisi C-17. Hidroksil dari C-3 berfungsi sebagai donor ikatan hidrogen dan C-17 hidroksi berfungsi sebagai akseptor ikatan hidrogen. Inti hidrokarbon yang relatif datar menyebabkan energi afinitas estrogen rendah, hal inilah yang menyebabkan kecocokan geometri dari kedua



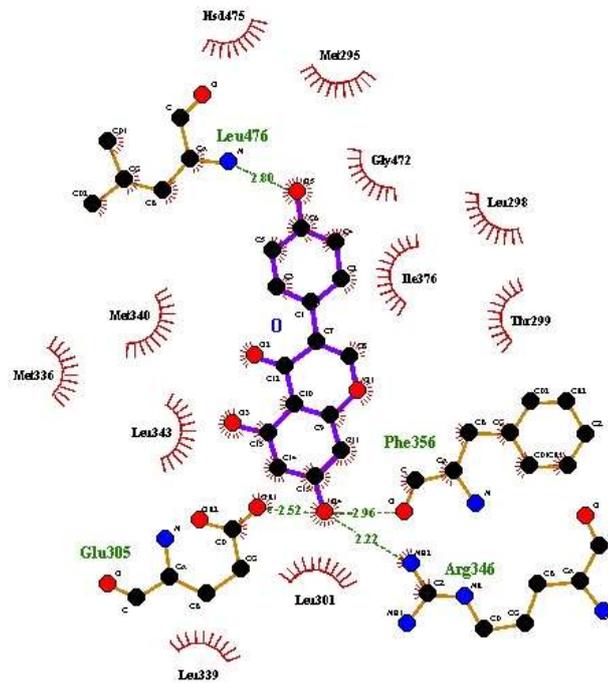
Gambar 3. Hasil ligplus Interaksi RE β dengan Estrogen

Seperti kita lihat pada Gambar 3 Estrogen yang terikat dengan RE β memiliki energi afinitas paling negatif yaitu sebesar -6,8 kkal/mol. Gugus hidroksi fenolik membentuk ikatan hidrogen dengan Leu 476 dengan panjang ikatan 3.07 Å. Dua ikatan hidrogen yang lain terbentuk dari gugus hidroksi fenolik membentuk ikatan hidrogen dengan Arg 346 dan Glu 305. Dari hasil perhitungan dengan menggunakan metode ONIOM, terdapat muatan mulliken pada Arg 346 dan Leu 476. Hal ini menguatkan bahwa residu Arg 346 dan Glu 305 mempunyai peranan sebagai residu katalitik dalam pengikatan ligan estrogen dengan reseptornya. Pada gambar 4 menunjukkan hasil ligplus interaksi RE β dengan Faktor 2.

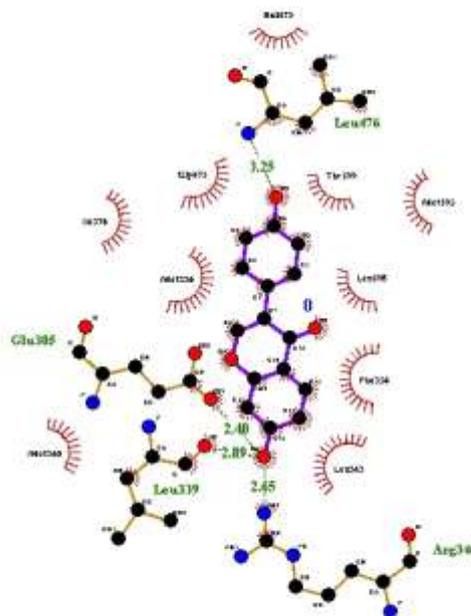


Gambar 4. Hasil ligplus Interaksi RE β dengan Faktor 2

Dibandingkan dengan isoflavon lain, faktor 2 memiliki afinitas ikatan jauh lebih tinggi hal ini dikarenakan secara struktural faktor 2 memiliki tiga gugus hidroksil pada posisi C-6, C-7 dan C-4 sehingga probabilitas untuk membentuk ikatan hidrogen tinggi. Pada Gambar 4, terlihat ada tujuh ikatan hidrogen antara ligan dan RE β , hal inilah yang menyebabkan faktor 2 lebih stabil sehingga energi afinitas dari faktor 2 ini rendah bahkan mendekati energi afinitas estrogen yaitu -6,7 kkal/mol. Asam amino yang berperan aktif terhadap pengikatan adalah Glu 305, Arg 346, Leu 339 dan Phe 356 dengan jenis ikatan hidrogen. Secara struktural genistein juga memiliki tiga buah gugus hidroksil pada posisi C-5, C-7 dan C-4 namun ternyata probabilitas terjadinya ikatan hidrogen lebih rendah dibandingkan dengan faktor 2, hal ini disebabkan karena pada genistein terjadi interaksi non ikatan antara atom oksigen dan atom hidroksil yang letaknya berdampingan dalam ligan genistein, sehingga energi afinitas dari genistein lebih rendah dibandingkan dengan faktor-2. Hasil ligplot dapat kita lihat pada Gambar 5. Residu asam amino yang berperan aktif adalah Glu 305, Arg 346, Phe 356 dan Leu 476.

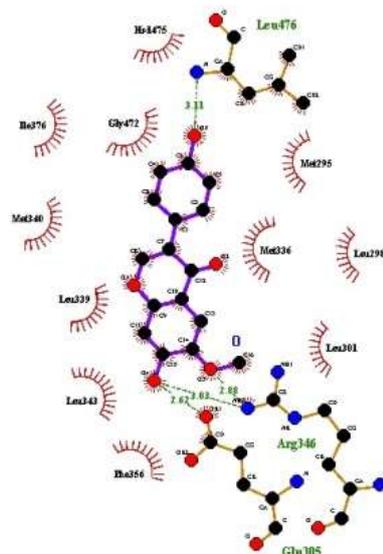


Gambar 5. Hasil ligplus Interaksi RE β dengan Genistein



Gambar 6. Hasil ligplus Interaksi RE β dengan Daidzein

Pada gambar 6, struktur daidzein terdapat dua gugus hidroksil sehingga mempunyai probabilitas terjadinya ikatan hidrogen lebih banyak, pada interaksi dengan RE β terdapat empat ikatan hidrogen sehingga menyebabkan daidzein lebih stabil sehingga energi afinitasnya lebih rendah daripada genistein. Pada pengikatan daidzein dan reseptor estrogen β , asam amino yang berperan aktif adalah Glu 305, Leu 339, Arg 346 dan Leu 476.



Gambar 7. Hasil ligplus Interaksi RE β dengan Glisitein

5. Kesimpulan

Isoflavon mempunyai energi afinitas yang rendah dengan presentasi interaksi diatas 90 % dengan jenis interaksinya ikatan hidrogen. Residu asam amino yang berperan aktif terhadap pengikatan dengan reseptor estrogen β adalah Glu 305, Arg 346 dan Leu 476. Oleh karena itu isoflavon dapat digunakan untuk menghambat proliferasi dan invasi sel kanker payudara.

6. Daftar Pustaka

- [1] Ayu, Monavia.R., 2021, Jenis Kanker yang paling Banyak Diderita Penduduk Indonesia, <https://databoks.katadata.co.id/datapublish/2021/06/29>
- [2] Lazennec G., Bresson D., Lucas A., Chauveau C., Vignon F.2001.*Erβ Inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. Endocrinology* 142 : 4120 – 4130.
- [3] Asih, I. A.R. Astiti., (2009), *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dari Kacang Kedelai (Glycine max)*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran., Jurnal Kimia 3, 1, 33-40.
- [4] Barz, W. Ang G.B. Papendorf., (1991) Metabolism of Isoflavones and Formation of Factor-2 by Tempeh Producing Microorganism. Tempeh Workshop, Cologne, 20 May 1991
- [5] Gyorgy, P., Murata,K., and Ikehata H., (1964), *Antioxidants isolated from fermented soybeans tempeh*. Nature. 203: 872-875.
- [6] Murata, K., 1985. Formation of antioxidant and nutrient in tempe. Asian Symposium on Non-salted Soybean Fermentation, Tsukuba, Japan, July 14-16, 1985.
- [7] Zilleken, F., 1986. *First draft meeting on Biotechnology*, BPP Teknologi, 11 Maret 1986, Jakarta

- [8] Pelkonen, O., Turpeinen, M., dan Raunio, H. 2011. "In Vivo In Vitro In Silico Pharmacokinetic Modelling in Drug Development", *Clinical Pharmacokinetics*, 50 (8): 483-491.
- [9] Radifar, M., Yuniarti, N., dan Istyastono, E. P. 2013. "PyPLIF: Python-based Protein-Ligand Interaction Fingerprinting". *Bioinformatics*, 9 (6): 325-328
- [10] Korb, O., Stutzle T., dan Exner, T. E. 2009. "Empirical Scoring Function for Advanced Protein Ligand Docking with PLANTS". *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49 (1): 84-96.
- [11] Trott O, Olson A., (2010), Autodock Vina: Improving The Speed and Accuracy of Docking with A New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J Comp Chem*. 31: 455-461.
- [12] Kuiper, G., Lemmen, J.G, Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H, Vandersaag, P.T., Vanderburg, B and Gustafsson, J.A. (1998) , *ENDOCRINOLOGY: Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β* . The Endocrine Society. 139, 4252-4263.
- [13] Handayani, Ira., (2006), Tesis, Studi Komputasi Interaksi 6,7,4'-trihidroksiisoflavon (faktor2) dengan Estrogen Reseptor β ., FMIPA, Institut Teknologi Bandung