

Artikel Penelitian

Penambatan molekular senyawa tangeretin dan kaempferol pada protein antiapoptosis Bcl-xL: studi *in silico*

Molecular docking tangeretin and kaempferol compound against antiapoptotic Bcl-xL: in silico study

Siska Febdian Nitami, Rifki Febriansah*

Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Jalan Brawijaya, Tamantirto, Kasihan, Bantul, Yogyakarta, Indonesia 55183

E-mail : rifki.febriansah@umy.ac.id

Abstrak

Tanaman yang dapat dikembangkan sebagai agen kemoprevensi kanker yaitu kulit jeruk (*Citrus reticulata*) dan daun teh (*Camellia sinensis*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi senyawa tangeretin dan kaempferol yang terdapat dalam masing-masing kulit jeruk daun teh sebagai agen kemoprevensi kanker secara *in silico*. Uji *in silico* menggunakan perangkat lunak Autodock Vina dengan menambatkan senyawa tangeretin dan kaempferol terhadap protein target Bcl-xL. Pada penambatan molekuler, senyawa tangeretin mempunyai afinitas -5,8 kkal/mol, sedangkan senyawa kaempferol mempunyai afinitas -6,4 kkal/mol. Tangeretin memiliki potensi yang kuat dalam aktivitas penghambatan terhadap protein Bcl-xL dan senyawa kaempferol kurang poten dalam inhibisi protein Bcl-xL.

Kata kunci: tangeretin, kaempferol, penambatan molekuler, apoptosis

Abstract

The plants that can be developed as a chemopreventive agent are orange peel (*Citrus reticulata*) and tea leaves (*Camellia sinensis*). This study aims to determine the chemopreventive agent of tangeretin and kaempferol *in silico*. In silico test was performed molecular docking by using Vina Autodock Software by deprecating tangeretin and kaempferol compounds against target protein Bcl-xL. Tangeretin and kaempferol have an affinity to the protein with score -5,8 kkal/mol and -6,4 kkal/mol, respectively. Tangeretin has a high potency in inhibiting activity against Bcl-xL protein, while kaempferol has less potency in inhibition of Bcl-xL protein.

Keywords: tangeretin, kaempferol, molecular docking, apoptosis

PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian di seluruh dunia. Pada tahun 2015, sekitar 8,8 juta kematian disebabkan oleh kanker. Berdasarkan data Globocan, International Agency for Research on Cancer (IARC) tahun 2008, kanker payudara menempati urutan pertama dari seluruh kanker pada perempuan di dunia. Sampai

saat ini terapi kanker payudara masih pada kemoterapi, radiasi dan operasi. Pada penderita kanker payudara, muncul berbagai protein yang abnormal sehingga terjadi perubahan perilaku sel yaitu meningkatnya proliferasi dan diferensiasi sel serta penurunan kemampuan apoptosis sel. Salah satu protein yang berperan dalam antiapoptosis adalah Bcl-xL.

Bcl-xL merupakan suatu protein transmembran tersusun dari 233 asam amino dengan berat molekul 26 kD. Selain terekspresi pada membran luar mitokondria, Bcl-xL juga terdapat pada membran retikulum endoplasma dan pada membran nukleus. Bcl-xL berperan dalam penghambatan jalur intrinsik apoptosis. Pada saat terdapat stimulus apoptosis, Bcl-xL yang terdapat pada membran luar mitokondria diikat oleh Bad, suatu protein Bcl-2 proapoptosis, sehingga Bcl-xL tidak dapat melakukan fungsinya dalam menghambat apoptosis (Touzeau et al., 2018).

Pengembangan obat dari bahan alam sangat menjanjikan untuk pengobatan kanker. Bahan alam yang potensial sebagai agen ko-kemoterapi adalah kulit jeruk (*Citrus reticulata*) dan daun teh (*Camellia sinensis* L.) (Meiyanto et al., 2007; Deptan, 2012). Senyawa flavonoid tangeretin dan kaempferol, yang masing-masing terdapat dalam kulit jeruk dan daun teh diperkirakan berperan pada aktivitas antikanker sehingga dapat dikombinasikan dengan obat kanker dan diharapkan bekerja secara sinergis sebagai ko-kemoterapi. Untuk mencapai hal tersebut, kami melakukan uji pendahuluan dengan studi *in silico* penambatan molekular senyawa tangeretin dan kaempferol pada protein Bcl-xL.

BAHAN DAN METODE

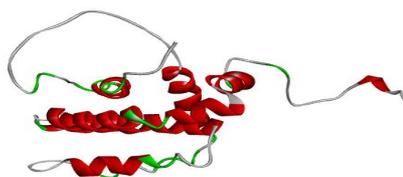
Metode penambatan molekular (*molecular docking*) menggunakan aplikasi Autodock Vina. Pengambilan struktur protein melalui Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) dengan PDB ID untuk Bcl-xL yaitu 1YSG dan 4TUH. Ligand asli (*native ligand*) dapat diambil langsung dari file protein target. Setelah itu, konversikan file protein dan ligan ke format file PDBQT dengan Autodock Tools dan Open Babel. Sebelum menjalankan fungsi *docking*, pastikan file 1ysg.pdbqt dan ligand.pdbqt telah berada di folder Vina. Kemudian buat text file baru dan beri nama conf.txt. Untuk menentukan nilai RMSD pilih konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Visualisasi hasil *docking* untuk melihat ikatan antara Bcl-xL dengan ligand uji (tangeretin dan kaempferol, *native ligand*) dapat dilakukan dengan aplikasi DS Visualizer.

Analisis data

Pada analisis *molecular docking*, dilakukan analisis data *score docking* pada sisi *binding pocket* terhadap senyawa tangeretin dan kaempferol dengan afinitas yang baik dinyatakan dengan nilai *score* terendah pada suatu molekul.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molecular docking merupakan metode komputerasi yang mampu memperkirakan interaksi suatu senyawa dengan protein melalui jalur energi terendah. Kode protein yang digunakan yaitu 1YSG dan 4TUH yang digunakan sebagai protein target dalam bentuk aktif yang berikatan dengan *native ligand*. Proses preparasi senyawa uji dengan optimasi struktur senyawa uji dilakukan dengan menggunakan bantuan program Marvin Sketch. Struktur 3D senyawa uji digambar lengkap dengan atom hidrogen setelah itu dilakukan optimasi konformasi. Pada uji ini dilakukan pada protein Bcl-xL yang berperan dalam proses apoptosis, struktur dari Bcl-xL dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Protein Bcl-xL (Oltersdorf dkk., 2005)

Docking dilakukan dengan cara melakukan *docking native ligand* pada reseptor. Metode *docking* dilakukan validasi dengan *redocking native ligand* pada *binding site* untuk mendapatkan nilai RMSD dan nilai dari RMSD serta *score docking* dari setiap ligan terhadap protein Bcl-xL pada kode protein 1YSG dan 4TUH dapat dilihat pada tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil *molecular docking* senyawa uji pada protein Bcl-xL (kode protein 1YSG)

No	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	Score Docking (kkal/mol)
1	Native Ligand	2	0,992	-6,4
2	Kaempferol	8	1,738	-6,7
3	Tangeretin	5	1,333	-4,5
4	5-Flurourasil	2	1,437	-4,9
5	Doxorubicin	2	1,207	-3,6

Tabel 2. Hasil *molecular docking* senyawa uji pada protein Bcl-xL (kode protein 4TUH)

NO	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	Score Docking (kkal/mol)
1	Native Ligand	3	1,422	-7,8
2	Kaempferol	3	1,930	-6,4
3	Tangeretin	2	1,132	-5,8
4	5-Flurourasil	5	1,513	-7,0
5	Doxorubicin	5	1,901	-4,5

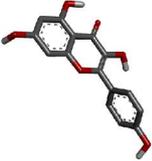
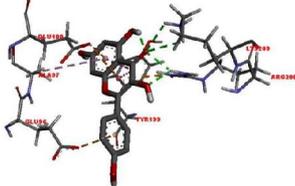
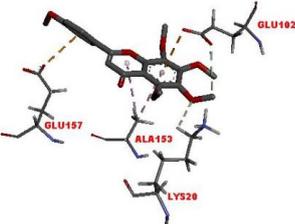
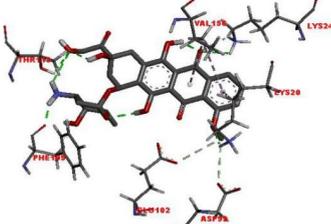
Hasil *docking* yang berupa skor yang menggambarkan kekuatan suatu ikatan yang stabil antara ligan dan reseptor. Semakin kecil skor yang diperoleh maka ikatan antara ligan dan reseptor semakin stabil, yang mana setiap senyawa uji akan menghasilkan sembilan konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda-beda sehingga dapat dipilih konformasi dengan nilai RMSD < 2Å. Senyawa kaempferol dan tangeretin dipilih konformasi ke-8 dan 5 pada kode protein 1YSG dengan nilai RMSD 1,738 Å dan 1,333 Å. Skor yang diperoleh yaitu -6,7 kkal/mol untuk senyawa kaempferol, dan -4,5 kkal/mol untuk senyawa tangeretin.

Ligan asli memiliki nilai RMSD 0,992 Å dan memiliki skor -6,4 kkal/mol pada konformasi ke-2. Berdasar hasil tersebut senyawa tangeretin memiliki skor lebih rendah dari ligan asli, sedangkan pada senyawa kaempferol lebih tinggi dari ligan asli. 5-flurourasil dan doksorubisin memiliki nilai RMSD masing-masing 1,437 Å dan 1,207 Å dengan skor -4,9 kkal/mol (konformasi kedua) dan -3,6 kkal/mol (konformasi kedua). Skor *docking* kaempferol tidak lebih baik dari 5-flurourasil dan doksorubisin, sedangkan skor *docking* tangeretin lebih baik dari 5-flurourasil tetapi tidak lebih baik dari doksorubisin.

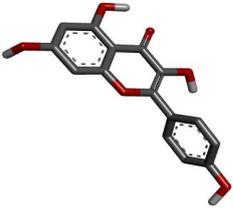
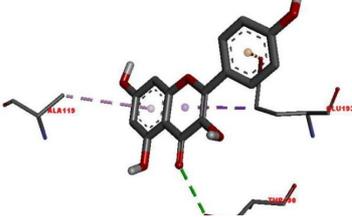
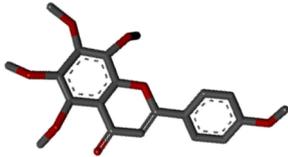
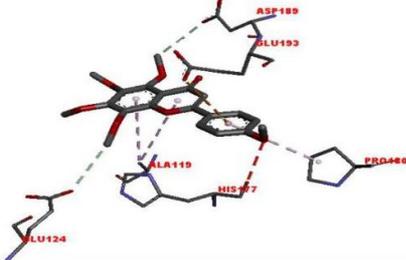
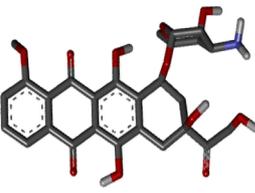
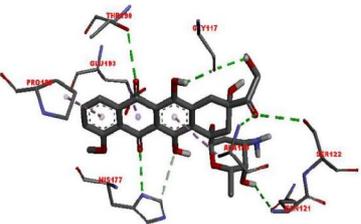
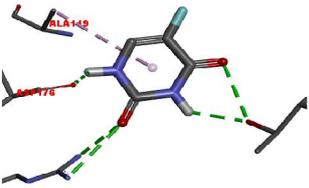
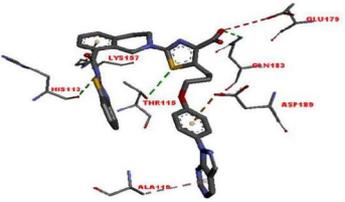
Senyawa kaempferol dan tangeretin dipilih konformasi ke-3 dan 2 pada kode protein 4TUH dengan nilai RMSD 1,422 Å dan 1,132 Å. Skor yang didapat yaitu -6,4 kkal/mol untuk senyawa kaempferol, dan -5,8 kkal/mol untuk senyawa tangeretin. Ligan asli memiliki nilai RMSD 1,422 Å dan memiliki nilai skor *docking* -7,8 kkal/mol pada konformasi ke-3. Berdasar hasil tersebut, senyawa kaempferol dan tangeretin memiliki nilai yang lebih baik dari ligan asli. 5-flurourasil dan doksorubisin memiliki nilai RMSD 1,513 Å dan 1,901 Å dengan skor *docking* -7,0 kkal/mol dan -4,5 kkal/mol pada konformasi ke 5 untuk 5-flurourasil maupun doksorubisin. Senyawa tangeretin dan kaempferol tidak lebih baik dari doksorubisin tetapi lebih baik dari 5-flurourasil terhadap protein Bcl-xL.

Senyawa yang diuji dan telah *didocking* dengan *Autodock Vina* dapat kita amati interaksinya secara visual menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, senyawa yang ditambahkan pada protein Bcl-xL akan berinteraksi dengan residu asam aminonya dan kemungkinan terjadinya ikatan antara senyawa yang di uji dan protein, hal ini dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

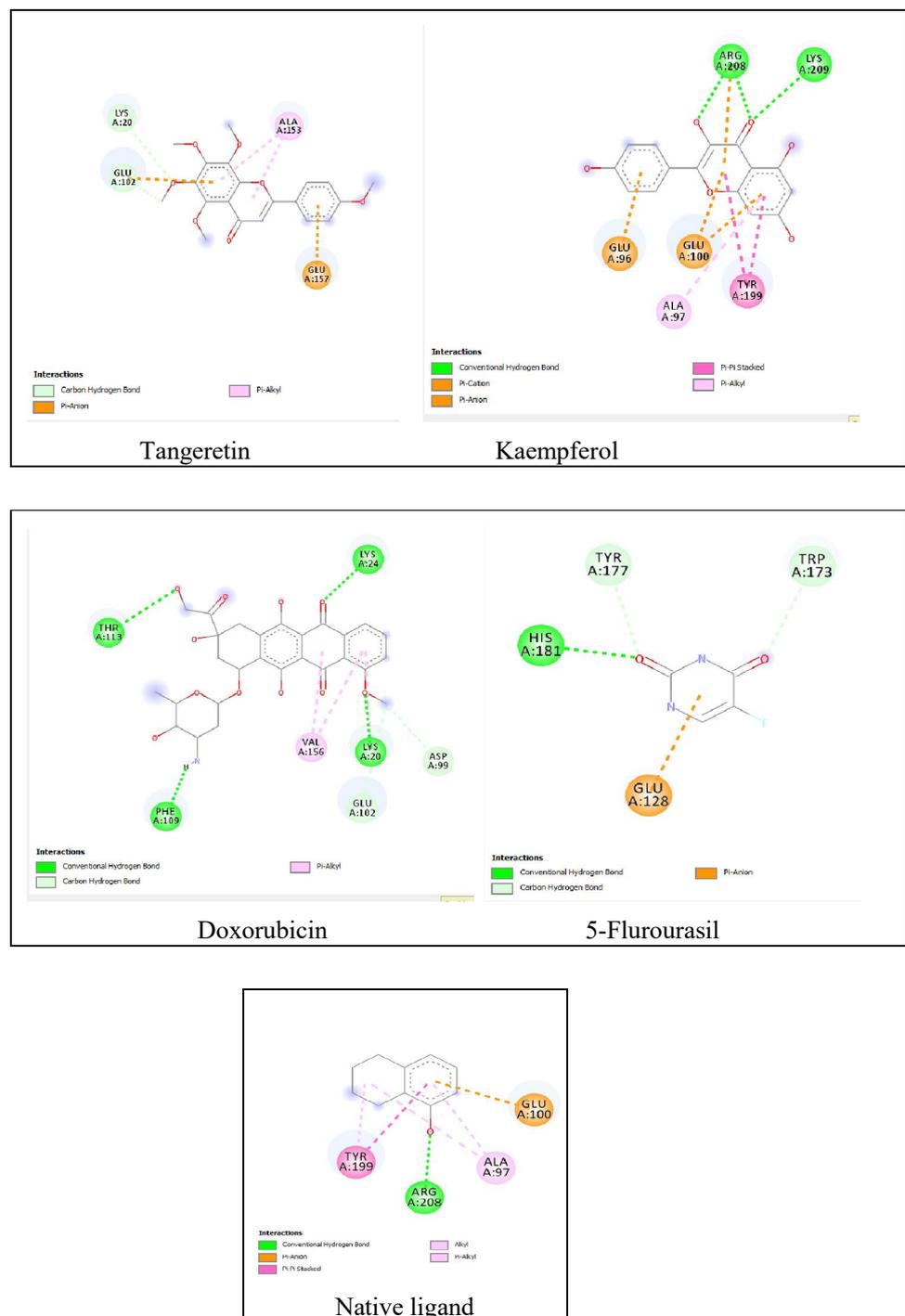
Tabel 3. Visualisasi interaksi senyawa uji dan protein Bcl-xL (IYSG)

No	Senyawa uji	Potensi ikatan asam amino
1	Kaempferol	Arginin (ARG 208), Lysin (LYS 209), Asam Glutamat (GLN 96,100), Alanin (ALA 97), Tirosin (TYR 199)
		
2	Tangeretin	Lysin (LYS 20), Alanin (ALA 153), Asam Glutamat (GLU 102,157),
		
3	Doksorubisin	Treonin (THR 113), Lysin (LYS 24,20), Fenilalanin (PHE 109), Valin (VAL 156), Asam Aspartat (ASP 99), Asam Glutamat (GLU 102)
		
4.	5-Flurourasil	Tirosin (TYR 177), Triptopan (TRP 173), Histidin (HIS 181), Asam Glutamat (GLU 128)
		
5	Ligan asli	Glutamat (GLU 188), Alanin (ALA 97), Arginin (ARG 208), Tirosin (TYR 199)
		

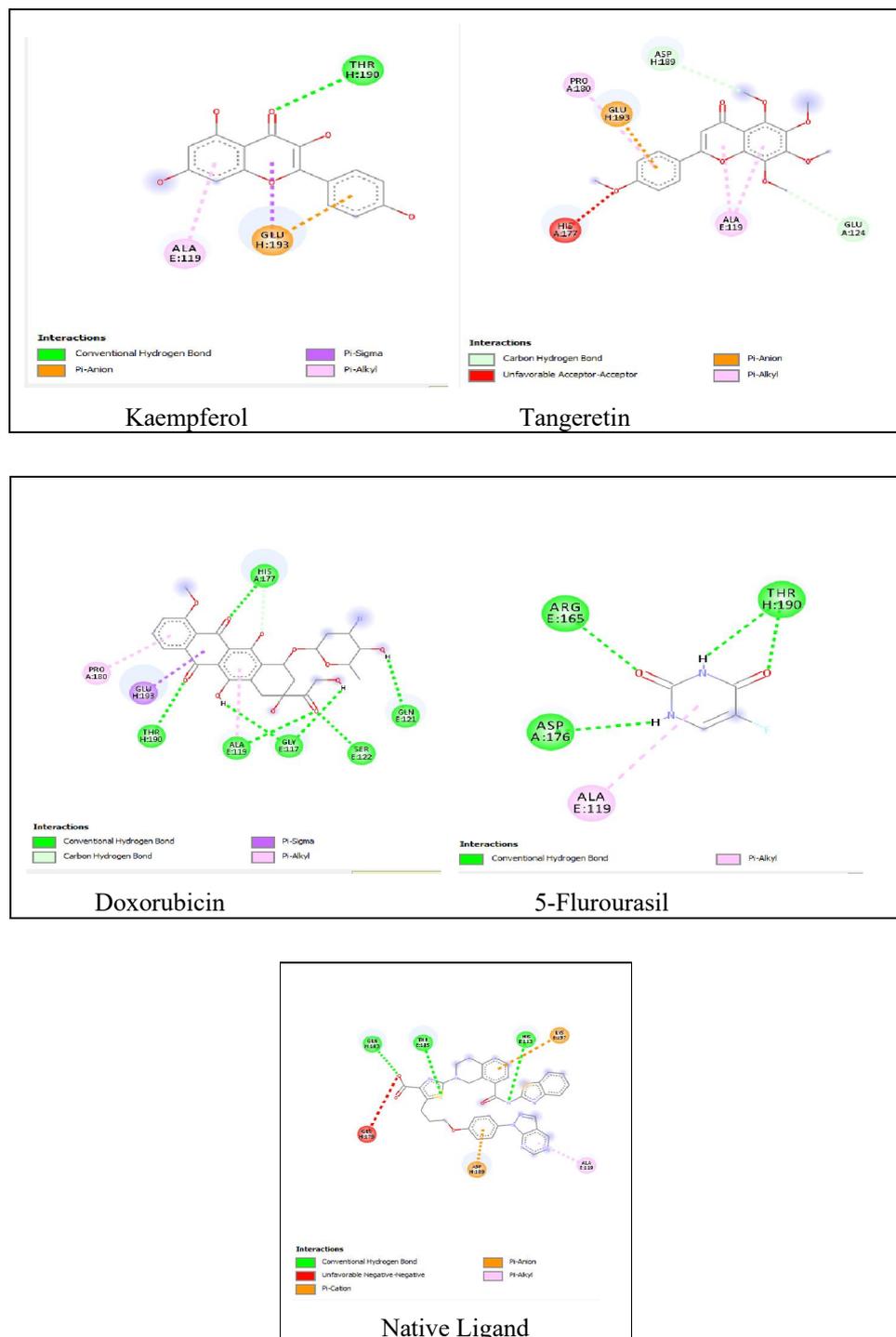
Tabel 4. Visualisasi interaksi senyawa uji dan protein Bcl-xL (4TUH)

No	Senyawa uji	Potensi ikatan asam amino
1	Kaempferol 	Treonin (THR 190), Alanin (ALA 119), Asam Glutamat (GLU 193) 
2	Tangeretin 	Asam Aspartat (ASP 189), Prolin (PRO 180), Asam Glutamat (GLU 193), Histidin (HIS 177), Alanin (ALA 119), Asam Glutamat (GLU 124) 
3	Doksorubisin 	Histidin (HIS 177), Alanin (ALA 199), Glutamat (121), Serin (122), Glisn (GLY 177), Treonin (THR 190), Asam Glutamat (GLU 193), Prolin; (PRO 180) 
4	5-Flurourasil 	Arginin (ARG 165), Treonin (THR 190), Asam Aspartat (ASP 176), Alanin (ALA 119) 
5	Ligan asli 	Lisin (LYS 157), Histidin (HIS 113), Alanin (ALA 119), Asam Aspartat (ASP 189), Asam Glutamat (GLU 179), Glutamin (GLU 183), Treonin (THR 115) 

Senyawa-senyawa uji yang berikatan dengan protein Bcl-xL pada *binding site* tertentu sehingga dapat berpotensi untuk berikatan dengan asam amino di sekitar *binding site*-nya. Jenis interaksi yang terbentuk antara senyawa uji dan residu asam amino protein Bcl-xL yaitu ikatan hidrogen dan seperti yang ditunjuk oleh Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Visualisasi 2D interaksi asam amino protein Bcl-xL (1YSG)



Gambar 3. Visualisasi 2D interaksi asam amino protein Bcl-xL (4TUH)

Hasil uji molecular docking menunjukkan bahwa ikatan antara senyawa flavonoid tangeretin terhadap protein Bcl-xL memiliki aktivitas inhibisi lebih stabil, sehingga aktivitasnya lebih tinggi terhadap Bcl-xL. Sedangkan senyawa flavonoid kaempferol memiliki aktivitas yang hampir sama dengan agen kemoterapi 5-fluorourasil dan *native ligand*. Hasil tersebut juga dapat dilihat pada visualisasi 3D menggunakan aplikasi DS Visualizer antara ligan dan senyawa target. Senyawa uji tangeretin sebanding dengan 5-fluorourasil yang mengikat 4 dan 6 ikatan hidrogen, berinteraksi pada asam amino lisin pada posisi 20 (LYS 20), Alanin pada posisi 153, 119 (ALA 153, 119), Asam Glutamat pada posisi 102, 157, 193, 124 (GLU 102, 157, 193, 124), Asam Aspartat pada posisi 189 (ASP 189), Prolin pada posisi 180 (PRO 180), Histidin pada posisi 177 (HIS 177) yang hampir sama dengan senyawa native ligand dan 5-fluorourasil tapi tidak dengan agen kemoterapi doksorubisin yang memiliki ikatan asam amino lebih banyak dibandingkan dengan tangeretin yang memiliki ikatan asam amino 7 dan 8.

Senyawa kaempferol mengikat 6 dan 3 ikatan hidrogen yang berinteraksi dengan asam amino Arginin pada posisi 208 (ARG 208), Lisin pada posisi 209, Asam Glutamat pada posisi 96,100,193 (GLU 96,100,193), Alanin pada posisi 97,119 (ALA 97,119), Tirosin pada posisi 199 (TYR 199), Treonin pada posisi 190 (THR 190). Kaempferol memiliki ikatan asam amino lebih banyak dibandingkan dengan native ligan yaitu 6 ikatan pada kode protein 1YSG dan mengikat 3 ikatan pada kode protein 4TUH. Kaempferol memiliki ikatan yang hampir sama dengan 5-fluorourasil, tapi tidak dengan doksorubisin yang memiliki ikatan asam amino yang lebih banyak. Semakin banyak ikatan yang terbentuk antara ligan dan protein target, maka potensi aktivitas suatu senyawa tersebut semakin kuat. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji tangeretin dengan uji *in silico* memiliki potensi yang kuat dalam aktifitas penghambatan terhadap protein Bcl-xL dan senyawa kaempferol kurang poten dalam inhibisi protein Bcl-xL, tetapi kekuatannya masih sebanding dengan ligan aslinya.

KESIMPULAN

Senyawa uji tangeretin dengan uji *in silico* memiliki potensi yang kuat dalam aktivitas penghambatan terhadap protein Bcl-xL dan senyawa kaempferol kurang poten dalam inhibisi protein Bcl-xL, tetapi kekuatannya masih sebanding dengan ligan aslinya.

REFERENSI

- Deptan, 2012. Kajian Umum Mengenai Tanaman Jeruk Available at http://ditlin.hortikultura.go.id/jeruk_cvpd/jeruk01.
- IARC GLOBOCAN 2008 Breast Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 Summary [internet]. 2010 [cited 2015 January 22]. Available in: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>.
- International Agency for Research on Cancer, WHO, 2014. World cancer report 2014. <http://id.scribd.com/doc/249125578/World-Cancer-Report-2014>.
- Meiyanto, E., Fitriyani, A., Rokhman, M.R., Latifah, N., Yunus, S.R., 2007. Penggunaan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) untuk Meningkatkan Sensitivitas Sel Kanker Payudara MCF-7 Terhadap Agen Kemoterapi Doxorubicin.
- Oltersdorf, T.H., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., et al, 2005, An Inhibitor of Bcl-2 Family Proteins Inducer Regression of Solide Tumors, *Nature*, 435,677-681.
- Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. 2018. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 32(9):1899-1907.

© The Author(s) 2019