

STUDI IN SILICO POTENSI ANTIKANKER PADA SENYAWA METABOLIT SEKUNDER BUAH MAKASSAR

**Rizqi Trianita Fariha¹, Safirda Syafa Yuhandiana², Zubaidah³, Muhammad Fadhil
Pratomo⁴, Auliani Ginantika Pertiwi⁵**

Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran, West Java - Indonesia

Email: yoohandiana@gmail.com

Abstrak

Kanker adalah penyakit dengan angka kematian tinggi akibat pertumbuhan tidak normal sel. Terapi kanker saat ini belum dapat menyembuhkan kanker seutuhnya sehingga perlu alternatif obat dari tumbuhan. Buah Makassar (*Brucea javanica* (L.) Merr.) diduga memiliki aktivitas antikanker. Penelitian dilakukan menggunakan metode in silico, berupa penambatan molekuler menggunakan Autodock Tools 4.2, skrining farmakofor menggunakan LigandScout 4.4.5, pemeriksaan terhadap aturan lipinski serta prediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, dan toksisitas dengan pre-ADMET. Selain itu, dilakukan uji toksisitas menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) metode vial dan microplate dengan hasil LC50 pada 198,07 ppm (microplate) dan 82,22 ppm (vial). Berdasarkan penambatan molekuler, nilai Binding Energy terbesar dimiliki bruceolide (-8,08 kkal/mol). Berdasarkan skrining farmakofor, nilai fit score terbesar diperoleh bruceine D (45,06).

Kata kunci: Kanker, *Brucea javanica* (L.) Merr, Studi in Silico, BSLT

Abstract

*Cancer is a disease with a high death rate due to abnormal cell growth. Current cancer therapy cannot completely cure cancer, so alternative medicines from plants are needed. Makassar fruit (*Brucea javanica* (L.) Merr.) is thought to have anticancer activity. The research was carried out using in silico methods, in the form of molecular docking using Autodock Tools 4.2, pharmacophore screening using LigandScout 4.4.5, examination of the Lipinski rule and prediction of absorption, distribution, metabolism and toxicity with pre-ADMET. In addition, a toxicity test was carried out using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) vial and microplate method with LC50 results at 198.07 ppm (microplate) and 82.22 ppm (vial). Based on molecular docking, bruceolide has the largest Binding Energy value (-8.08 kcal/mol). Based on pharmacophore screening, the largest fit score value was obtained for bruceine D (45.06).*

Keywords: Cancer, *Brucea javanica* (L.) Merr, Studi in Silico, BSLT

Received: Juli 2024

Reviewed: Juli 2024

Published: Juli 2024

Plagiarism Checker No 234

Prefix DOI : Prefix DOI :

10.8734/Nutricia.v1i2.365

Copyright : Author

Publish by : Nutricia



This work is licensed under
a [Creative Commons
Attribution-NonCommercial
4.0 International License](#)

PENDAHULUAN

Penyakit kanker adalah penyakit yang timbul akibat pertumbuhan tidak normal sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker. Kanker paru, hati, perut, kolorektal, dan kanker payudara adalah penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya. Kanker merupakan penyakit tidak menular yang memiliki ciri-ciri klinis berupa benjolan yang makin membesar karena pertumbuhan sel secara abnormal dan tidak terkendali yang dapat merusak jaringan sekitarnya dan menyebar ke tempat yang jauh dari asalnya (5).

Buah Makassar (*Brucea javanica* (L.) Merr.) merupakan salah satu tanaman yang digunakan dalam pengobatan secara tradisional. Buah makassar mengandung asam lemak linoleat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$) sebesar 52,89%. Minyak buah makassar merupakan bahan herbal yang dapat menurunkan stress akibat panas yang berpengaruh pada kadar glukosa dan kreatinine darah ternak (1). Ekstrak buah makassar mengandung senyawa kimia 2-Ethyl Hexanol (16,67%), O-Phthalic Acid Anhydride (0,24%), Ethyl Palmitat (0,48%), Palmitinic Acid (12,02%), Ethyl Oleat (5,6%), Linoleic Acid (52,89%), Di-(9-Octadecenoyl)-Glycerol (11,04%), dan Myristyl Oleat (1,09%) (8).

Eksplorasi aktivitas terapeutik buah makassar telah dilakukan sejak pertengahan 1900-an dan masih terus diteliti efek-efek baru dari bermacam metabolit sekunder tumbuhan tersebut. Aktivitas yang telah diketahui di antaranya sebagai antimalaria, antiparasit, antimikroba, antioksidan, antipiretik, dan antikanker. Terkait aktivitas antikanker, ekstrak *B. javanica* menunjukkan aktivitas pada berbagai jenis sel kanker, seperti kanker paru, kanker usus besar, kanker rongga mulut, kanker prostat, kanker payudara, kanker hati, kanker pankreas, dan kanker lambung (13).

Tirosin kinase merupakan salah satu enzim yang dapat memindahkan grup fosfat dari ATP ke residu tirosin pada protein. Tirosin kinase merupakan subgrup dari kelas protein kinase. Tirosin kinase berfungsi sebagai pengatur jalur pensinyalan yang diaktifkan sejumlah faktor pertumbuhan dan sitokin. Tirosin kinase terdiri dari tyrosine kinase 2, JAK1, JAK2, JAK3. Janus kinase 2 (JAK2) memiliki peran kunci dalam berbagai penyakit neoplastik dan banyak diekspresikan dalam berbagai jenis sel. Aktivasi JAK2/signal transduser dan aktivator jalur pensinyalan transkripsi 3 (STAT3) memiliki peran penting pembentukan dan perkembangan berbagai jenis sel tumor manusia (16). Oleh karena itu, blokade jalur pensinyalan JAK2/STAT3 mampu menghambat proliferasi sel dan memicu apoptosis sel kanker manusia (7). Kristal 3D JAK2 memiliki kode PDB 2B7A (14).

Skrining virtual merupakan salah satu metode dalam desain obat dengan bantuan komputer yang berperan dalam penemuan senyawa hit baru (10), (4). Desain obat dengan kimia komputasi terdiri atas desain obat berbasis struktur dan berbasis ligan (2). Salah satu desain obat berbasis ligan adalah pemodelan farmakofor untuk mengembangkan model farmakofor yang dapat digunakan dalam seleksi senyawa hit baru terhadap basis data yang mengandung sejumlah besar senyawa (3).

Model farmakofor yang baik harus memiliki nilai AUC-ROC lebih dari 0,5 serta nilai GH yang lebih dari 0,7. Nilai AUC-ROC yang mendekati 1 menunjukkan model farmakofor yang semakin baik karena mampu membedakan antara senyawa aktif dengan decoy (senyawa yang

tidak aktif/pengecoh) (2). Secara garis besar, prosedur pemodelan farmakofor terdiri dari preparasi, pembuatan farmakofor, validasi, dan skrining senyawa uji (3).

Skrining virtual dilakukan dengan menggunakan model farmakofor yang telah divalidasi menggunakan website Pharmit menghasilkan sebanyak 1500 senyawa hit. Penambatan molekuler bertujuan untuk memprediksikan modus pengikatan atau interaksi antara ligan dan protein serta energi ikatan mereka (18).

Validasi proses penambatan molekuler dilakukan dengan penambatan ulang ligan alami PU2 dan protein yang diperoleh dari protein data bank. Validasi ini bertujuan untuk menilai kemampuan proses penambatan molekul dalam menghasilkan konformasi ligan yang mirip dengan hasil eksperimen (15).

Perlu dilakukan penelitian awal untuk mengetahui suatu tanaman memiliki potensi sebagai antikanker. Salah satu metode awal untuk uji sitotoksik adalah Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (12).

Pengujian ini bertujuan untuk mencari senyawa metabolit sekunder dalam tanaman buah makasar yang memiliki potensi sebagai antikanker. Pengujian ini dilakukan dengan metode structure based drug design menggunakan aplikasi Autodock Tools 4.2 serta ligand based drug design menggunakan aplikasi LigandScout 4.4.5.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah komputer dengan CPU Intel® Core (TM) i5-8250U CPU up to 3.4 GHz, Windows 10 64-Bit Operation System. Perangkat lunak yang digunakan adalah AutoDockTools versi 1.5.6, Discovery Studio 2020 Client, ChemDraw, Chem3D, dan LigandScout.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah ekstrak buah makasar, MC Cellulose pH 101, Low-substituted HydroxyPropyl Cellulose (L-HPC), Talkum, Ac di sol 2%, Mg Stearat 1%, serta reseptor Janus kinase 2 (JAK2) PDB: 2B7A.

Prosedur

a. Prediksi Lipinski

Ligan yang digunakan adalah senyawa-senyawa metabolit sekunder dari Brucea javanica yaitu Bruceajavanin A, Bruceantine, Bruceine A, Bruceine B, Bruceine D, Bruceolide, Bruceoside A, Bruceoside B, Brusatol, dan Canthine-6-one dengan mengunduh senyawanya pada <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format .sdf. Masukkan senyawa pada website <http://www.swissadme.ch/index.php>, lalu jalankan website hingga mendapatkan nilai yang dibutuhkan. Analisis senyawa tersebut berdasarkan aturan lipinski.

b. Prediksi ADMETOKS

Senyawa metabolit sebelumnya dimasukkan pada website <https://preadmet.bmdrc.kr/> untuk menguji pada parameter yang telah disediakan. Analisis hasil ADME yang dihasilkan.

c. Preparasi Senyawa Uji

Persiapan senyawa uji menggunakan ChemDraw dan Chem3D yang sebelumnya telah dilihat struktur senyawa uji di pubchem. Buka aplikasi chemdraw (ultra/professional) dan gambar senyawa uji di chemdraw, buat benzena, lalu percabangannya, kemudian sesuaikan atom penyusunnya (Jika capslock harus di capslock juga). Simpan file (format cdx) kemudian buka aplikasi chem3D untuk mengkonversi struktur 2D menjadi 3D. Buka file chemdraw yang sebelumnya (2D dalam format cdx) dan lakukan minimisasi energi untuk memberikan konformasi dalam struktur yang dimiliki menuju bentuk yang natural karena terjadi energi antar setiap molekul (MM2 = molecular mechanic, MMFF = molecular mechanic force fields)

Tekan MM2 lalu tunggu proses complete, sampai ada keterangan calculation ended (berhasil di kalkulasi), semakin kompleks prosesnya semakin lama. Terakhir save struktur senyawa uji dalam format pdb yang akan dilanjutkan pada tahap pengujian).

d. Preparasi Reseptor dan Ligan Alami

Masukkan 4 digit kode struktur molekul reseptor yang diperoleh dari jurnal acuan. Unduh struktur molekul yang digunakan pada RCSB. Organisme target manusia (homo sapiens), Method : x-ray diffraction (metode terbaik), resolusi : <2,2 (resolusi baik). Masukkan struktur ke biovia. Pastikan struktur memiliki active sites. Pisahkan reseptor dan ligan. Lakukan desolvasi air dengan menekan water dan tombol delete di keyboard. Desolvasi dilakukan untuk menghindari kegagalan interaksi hidrofobik ligan dan reseptor, karena relatif nonpolar. Simpan bagian reseptor, maka hapus ligan, lalu save ke folder uji yang disimpan di dekstop dengan format (.pdb). Rename reseptor. Redo penghapusan ligan, lalu ubah menjadi hapus reseptornya sehingga tersisa ligan. Save dengan format (.pdb).

Buka aplikasi AutoDockTools-1.5.6. Buka file ligan.pdb kemudian tambahkan atom hidrogen dengan cara "Edit" > "Hydrogen" > "Add" > "All Hydrogens" > "NoBoundOrder" > "Yes" > "OK" kemudian "Edit" > "Hydrogen" > "Merge Nonpolar". Ligan diberi muatan Gasteiger dan torsi. Kemudian save dengan format (.pdbqt) dan beri nama Ligan.pdbqt. Buka file reseptor.pdb kemudian klik "Edit" > "Hydrogen" > "Add" > "Polar only" > "NoBoundOrder" > "Yes" > "OK", tidak perlu merge nonpolar. Kemudian reseptor diberi muatan Kollman dan di-save dengan format (.pdbqt) dengan nama file Reseptor.pdbqt.

e. Membuat Parameter Grid Dan Docking

Membuat parameter grid dengan aplikasi AutoDockTools-1.5.6. Buka file Ligan.pdbqt dan Reseptor.pdbqt kemudian klik "Grid" > "Macromolecules" > "Choose" > "Receptors" > "Select" > "Yes" > "OK", kemudian klik lagi "Grid" > "Set map Types" > "Ligands" > "Select ligand", kemudian klik lagi "Grid" > "Grid Box" > "Center" > "Center on Ligand" > "File" > "Saving Current". Selanjutnya file di save dengan format gpf dan diberi nama dock.gpf. Membuat parameter docking dengan aplikasi AutoDockTools-1.5.6. Klik "Docking" >

"Macromolecules" > "Set Rigid File name" > klik file Reseptor.pdbqt. Kemudian klik lagi "Docking" > "Ligand" > "Choose" > "Select Ligand" > "Accept" > "Docking" > "Search parameter" > Genetic Algorithm > isi GA Runs dengan "100" > "Accept" > "Docking" > "Docking parameters" > "Accept" > "Docking" > "Output" > "Lamarckian" > Simpan file dengan format. dpf, beri nama file Dock.dpf. Selanjutnya lakukan proses docking menggunakan fitur "Command Prompt"

f. Analisa Hasil Validasi Docking serta Visualisasi

Buka Biovia Discovery Studio untuk membuka file Dock.dlg menggunakan notepad kemudian cari nilai RMSD, energi ikatan, dan kluster. Untuk mengetahui nilai Konstanta Inhibisi gunakan aplikasi AutoDockTools-1.5.6, klik "Analyze" > "Docking" > "Open" > klik file dock.dlg > "Open" > "OK", kemudian klik "File" > "Read molecules" > Receptor pdbqt > "Analyze" > "Macromolecules" > "Open" > "Receptors" > "Analyze" > "Conformities" > "Load" > Klik hasil docking yang memiliki rank pertama, dan terdapat data energi ikatan dan konstanta inhibisinya.

g. Pembuatan Database Active dan Senyawa Uji

Buka LigandScout dan klik kolom Ligand Based. Open File, pilih file hasil download Active/Decoy. Pastikan pada bagian 'type' pada senyawanya 'training'. Klik salah satu senyawa lalu klik ctrl+A. Save database dengan format .ldb.

Klik 'Restore Default' pada bagian 'file' untuk mereset ligandScout. Klik kolom 'Ligand Based'. 'Open File' pilih senyawa uji yang telah dibuat 3D. Masukkan satu persatu menggunakan 'Insert'. Pastikan pada bagian 'type' semua senyawa bertipe 'Test'. Save database dengan format .ldb.

h. Pemodelan Farmakofor

Buka LigandScout/Klik 'Restore Default' pada bagian 'File' untuk mereset. Klik bagian 'Ligand Based'. Open File, Pilih database Active yang telah dibuat sebelumnya. Pastikan semua senyawa telah diminimisasi, klik 'Cluster' untuk membuat cluster pada semua senyawa. OK atau Next setiap tahap yang diminta. Setelah dibuat cluster lalu sort by cluster urutan senyawanya dengan klik kolom 'Cluster ID'. Lalu sisakan satu senyawa bertipe 'Training' pada setiap cluster sisanya dibuat 'Ignored'. Setelah mendapatkan satu tipe file training pada tiap custernya, Klik 'Create Pharmacophore' tombol sebelah pembuatan cluster. OK atau Next setiap tahap yang diminta lalu tunggu hingga selesai. Didapatkan 1-10 sampai model farmakofor

i. Validasi Farmakofor

10 model yang telah didapatkan sebelumnya di tes satu persatu. Memindahkan 1 model dengan klik 'Copy to other perspective'. Klik Icon warna hijau pada bagian tengahnya. Klik 'Screening Perspective', model dipindahkan pada kolom 'Screening'. Pada kolom screening, klik 'Load Screening Database' pilih database active dan decoy dengan format .ldb-

nya yang sebelumnya dibuat. Tandai database yang telah dimasukan dengan warna 'hijau' untuk Active dan 'merah' untuk Decoy. Lalu klik 'Perform Screening' dan ligandscout akan menskrining. Setelah selesai untuk melihat validitas klik 'Plot ROC Curve'. Lihat AUC, yang mana minimal AUC 0.70. Lakukan pada kesepuluh model dan pilih ROC terbaik. Semakin mendekati 1 semakin baik. Didapatkan model terbaik

j. Skrining Senyawa Uji

Pada kolom 'Screening' Klik 'Load Screening Database' pilih database senyawa uji yang sebelumnya dibuat. Tandai database tersebut dengan warna hijau dan hilangkan warna pada database lain. Lalu pada bagian 'Ligand Based' pindahkan model terbaik ke kolom 'Screening'. Setelah sudah masuk semua lalu klik 'Perform Screening'. Tunggu sampai selesai hingga didapatkan senyawa yang hit.

k. Uji Toksisitas Brine Shrimp Lethality Bioassay

Membuat air laut buatan sebagai medium dengan 40 gram garam laut dilarutkan 1 liter air suling, tambahkan 6 gram ragi. Masukkan telur larva udang sebanyak 17 gram dan tunggu hingga menetas selama 24 jam.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menghaluskan 50 gram buah makasar dan dimasukkan ke dalam gelas beaker, menambahkan aquades sebanyak 200 ml dan dipekatkan dalam penangas air. Didapatkan ekstrak kental buah makasar dan dihitung konsentrasinya.

Membuat variasi konsentrasi buah makasar dengan konsentrasi awal 50.000 ppm, dilakukan pengenceran hingga didapatkan variasi 26,875; 53,75; 107,5; 215; 430; 860; 1720; dan 3440 ppm.

Untuk metode pengujian menggunakan vial, menyiapkan 21 vial dengan 10 larva udang dan menambahkan ekstrak hingga genap 10 mL dan air garam 5 mL, biarkan vial terbuka selama 24 jam di bawah lampu. Catat larva yang hidup dan mati.

Untuk metode pengujian menggunakan microplate, mengambil 100 μ L air berisi larva. Catat larva yang terambil dan masukkan pada tiap sumur, tambahkan ekstrak buah makasar 100 μ L dengan berbagai variasi konsentrasi. Biarkan hingga 24 jam di bawah lampu, catat larva yang mati dan hidup. Kemudian masukkan etanol ke dalam semua well lalu tunggu selama 15 menit. Hitung kembali jumlah udang setiap well.

HASIL

No.	Nama Senyawa	Aturan Lipinski	Keterangan
1	Bruceeajavanin A	BM: 568.7 Log P: 5.9500 Ikatan Donor: 0 Ikatan Akseptor: 7	Tidak Memenuhi

2	Bruceamtine	BM: 548.6 Log P: 1.1531 Ikatan Donor: 3 Ikatan Akseptor: 11	Tidak Memenuhi
3	Bruceine A	BM: 522.5 Log P: 0.5969 Ikatan Donor: 3 Ikatan Akseptor: 11	Tidak Memenuhi
4	Bruceine B	BM: 480.5 Log P: -0.4293 Ikatan Donor: 3 Ikatan Akseptor: 11	Memenuhi
5	Bruceine D	BM: 410,4 Log P: -1.9532 Ikatan Donor: 5 Ikatan Akseptor: 9	Memenuhi
6	Bruceolide	BM: 438.4 Log P: -1.0001 Ikatan Donor: 4 Ikatan Akseptor: 10	Tidak Memenuhi
7	Bruceoside A	BM: 682.7 Log P: -2.3686 Ikatan Donor: 6 Ikatan Akseptor: 16	Tidak Memenuhi
8	Bruceoside B	BM: 682.7 Log P: -2.2245 Ikatan Donor: 6 Ikatan Akseptor: 16	Tidak Memenuhi
9	Brusatol	BM: 520.5 Log P: 0.5170 Ikatan Donor: 3 Ikatan Akseptor: 11	Tidak Memenuhi
10	Canthine-6-one	BM: 220.23 Log P: 2.39	Memenuhi

		Ikatan Donor: 0 Ikatan Akseptor: 1	
--	--	---------------------------------------	--

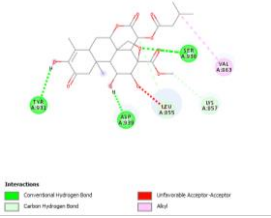
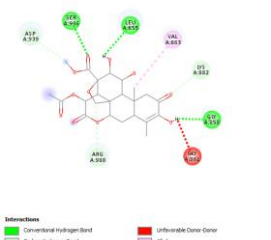
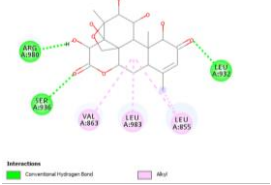
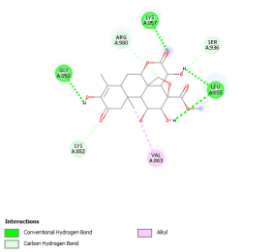
Tabel 1. Hasil prediksi Rules of Five Lipinski menunjukan 3 senyawa memenuhi aturan Lipinski, yaitu Bruceine B, Bruceine D, dan Canthine-6-one.

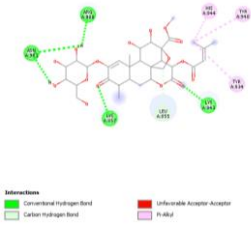
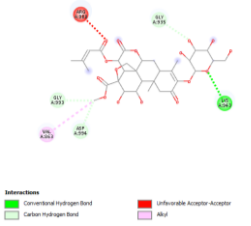
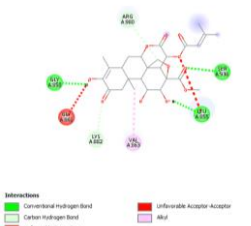
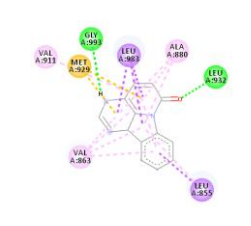
No.	Nama Senyawa	Prediksi ADME	Prediksi Toksisitas
1	Bruceeajavanin A	Memenuhi	non-mutagen Rat : negative mice : - mouse : positive
2	Bruceamtine	Memenuhi	non-mutagen Rat : negative mice : - mouse : positive
3	Bruceine A	Memenuhi	non-mutagen Rat : negative mice : - mouse : positive
4	Bruceine B	Memenuhi	non-mutagen Rat : positive mice : - mouse : negative
5	Bruceine D	Memenuhi	Non-mutagen Rat : positive mice : - mouse : positive
6	Bruceolide	Memenuhi	Non-mutagen Rat : positive mice : - mouse : negative
7	Bruceoside A	Memenuhi	Non-mutagen Rat : positive mice : -

			mouse : positive
8	Bruceoside B	Memenuhi	Non-mutagen Rat : positive mice : - mouse : positive
9	Brusatol	Memenuhi	Non-mutagen Rat : positive mice : - mouse : positive
10	Canthine-6-one	Tidak Memenuhi	Mutagen Rat : negative mice : - mouse : positive

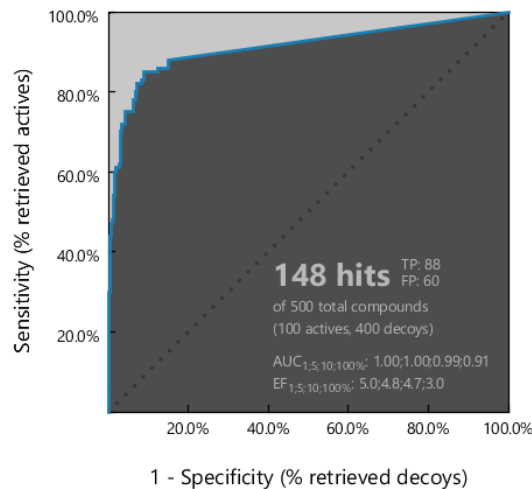
Tabel 2. Hasil prediksi ADME menunjukkan semua senyawa memenuhi parameter ADME. Pada prediksi toksisitas hanya satu senyawa yang merupakan mutagen, Canthine-6-one.

No.	Hasil Visualisasi	
1	Bruceejavanin A	Binding energy : -8.06 (kcal/mol) Ki : 1.23 uM
2		Binding energy : -7.98 (kcal/mol) Ki : 1.41 uM

	Bruceamntine	
3	 Bruceine A	Binding energy : -7.2 (kcal/mol) Ki : 255.38 nM
4	 Bruceine B	Binding energy : -7.48 (kcal/mol) Ki : 3.32 nM
5	 Bruceine D	Binding energy : -6.4 (kcal/mol) Ki : 20.38 uM
6	 Bruceolide	Binding energy : -8.08 (kcal/mol) Ki : 1.2 uM

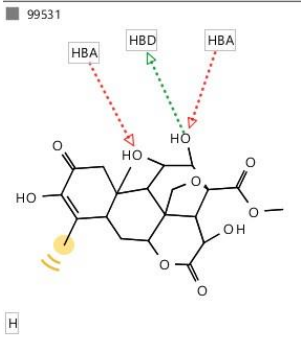
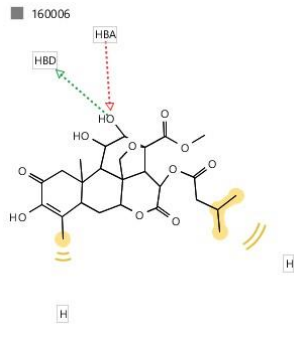
7	 Bruceoside A	Binding energy : -6.09 (kcal/mol) Ki : 34.42 uM
8	 Bruceoside B	Binding energy : -5.35 (kcal/mol) Ki : 120.75 uM
9	 Brusatol	Binding energy : -7.6 (kcal/mol) Ki : 5.25 uM
10	 Canthine-6-one	Binding energy : -7.56 (kcal/mol) Ki : 2.88 uM

Tabel 3. Hasil Visualisasi dan Molecular Docking menunjukan senyawa uji dengan energi bebas Gibbs (ΔG_{bind}) terkecil adalah Bruceolide, yakni sebesar -8,08.



Gambar 1. Hasil pengujian farmakofor menunjukan grafik AUC pada model 4 memiliki nilai AUC tertinggi yang mendekati 1 yaitu 0.91

No.	Gambar	Pharmacophore Fit-Score
1		45,06
2		44,76

3		44,76
4		43,24

Tabel 4. Hasil pengujian farmakofor menunjukan terdapat 4 senyawa yang hit dari 10 senyawa, yaitu Bruceine D (1), Bruceine B (2), Bruceolide (3), dan Bruceine A (4) dengan nilai Fit-score tertinggi yaitu Bruceine D sebesar 45,06.

Konsentrasi (ppm)	Jumlah kematian	Total populasi	Rata-Rata Kematian (%)
51,648	3	10	26,765%
	1	13	
	4	17	
103,296	2	13	19,455%
	4	17	
	2	19	
223,808	5	11	48,79%

	8	17	
	7	13	
430,4	12	15	77,95%
	9	13	
	11	13	
860,8	10	12	86,29%
	11	13	
	10	11	
1.721,6	13	13	96,67%
	11	11	
	9	10	

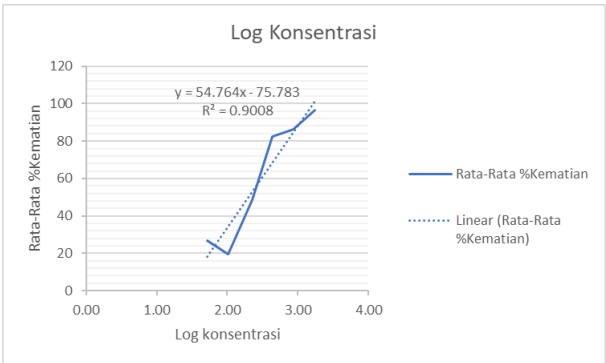
(a) Hasil Metode Microplate

Konsentrasi (ppm)	Jumlah kematian	Total populasi	Rata-rata% Kematian
51,648	4	10	30%
	2	10	
	3	10	
103,296	6	10	56,67%
	4	10	
	7	10	
223,808	10	10	100%

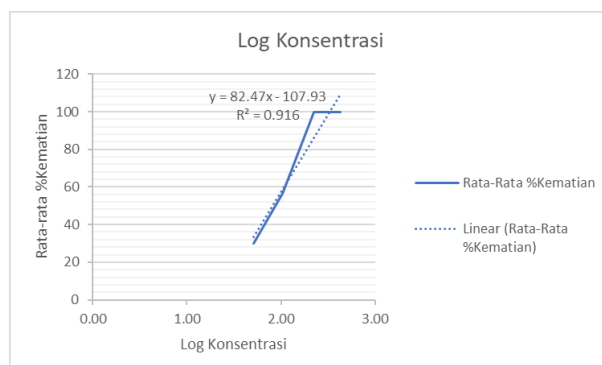
	10	10	
	10	10	
430,4	10	10	100%
	10	10	
	10	10	
860,8	10	10	100%
	10	10	
	10	10	
1.721,6	10	10	100%
	10	10	
	10	10	
3.443,2	10	10	100%
	10	10	
	10	10	

(b) Hasil Metode Vial

Tabel 5. Rata-rata% kematian pengujian BSLT metode microplate (a) dan vial (b)



(a) Log Konsentrasi Metode Microplate



(b) Log Konsentrasi Metode Vial

Gambar 2. Kurva hasil Log konsentrasi pengujian BSLT metode microplate dengan LC50=198.07 ppm (a) dan metode vial (b) dengan LC50 = 82.22 ppm

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, dilakukan studi interaksi dengan menambatkan beberapa senyawa bahan alam yang terkandung dalam buah makasar (*Brucea javanica* L.) dengan protein target Antikanker PDB ID: 2B7A dengan komposisi kimia 2-Ethyl Hexanol sebesar 16.67%, O-Phthalic Acid Anhydride sebesar 0.24%, Ethyl Palmitat 0.48%, Palmitinic Acid sebesar 12.02%, Ethyl Oleat 5.6%, Linoleic Acid 52.89%, Di-(9-Octadecenoyl)-Glycerol sebesar 11.04% dan Myristyl Oleat sebesar 1.09% (8).

Molecular docking atau penambatan molekuler dilakukan secara komputasional untuk memprediksi ikatan nonkovalen dari makromolekul (protein target) dengan molekul kecil (ligan) secara efisien. Tujuan utama dari penambatan molekuler adalah memprediksi konformasi ikatan berupa posisi dan jenis ikatan serta afinitas ikatan berdasarkan energi ikatan. Prediksi ini dinilai penting bagi perkembangan dari senyawa-senyawa yang diduga memiliki aktivitas biologis untuk dijadikan senyawa penuntun bagi perkembangan obat selanjutnya (17).

Proses penambatan molekuler dengan menyiapkan reseptor yang akan digunakan. Pada tahap penyiapan reseptor struktur makromolekul yang digunakan dari Protein Data Bank. Program yang digunakan penambatan molekuler adalah AutoDockTools versi 1.5.6, Discovery Studio 2020 Client, ChemDraw dan Chem3D.

Tabel 1 memperlihatkan hasil prediksi Rules of Five Lipinski menunjukkan 3 senyawa memenuhi aturan Lipinski, Bruceine B, Bruceine D, dan Canthine-6-one. Aturan lipinski membantu dalam mengamati permeabilitas obat terhadap lipid bilayer pada tubuh target dan juga untuk pertimbangan senyawa aktif yang diadministrasikan secara oral. Syarat lipinski meliputi berat molekul <500, jika lebih akan sulit menembus membran sel, log P <5, jika lebih maka akan lipofilik atau terikat sangat kuat dengan membran sehingga sulit untuk mengenali enzim target dan juga bersifat toksik tapi jika terlalu kecil atau bernilai negatif juga tidak baik karena akan sulit untuk menembus membran lipid bilayer, ikatan hidrogen donor <5, energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi, dan ikatan hidrogen akseptor <10, energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi. Senyawa uji dikatakan memenuhi persyaratan untuk dibentuk sediaan oral apabila tidak lebih dari satu pelanggaran terhadap aturan Lipinski. Senyawa uji yang memenuhi RO5 adalah Bruceine B, Bruceine D, and Canthine-6-one.

Tabel 2 memperlihatkan hasil prediksi ADME menunjukkan semua senyawa memenuhi parameter ADME. Pada prediksi toksisitas hanya satu senyawa yang merupakan mutagen, Canthine-6-one. Pengujian Pre-ADMET bertujuan menganalisa parameter awal farmakokinetik yang terdiri dari bagian-bagian Molecular Description Calculation, Drug-Likeness Prediction, ADME Prediction, Toxicity Prediction. Parameter yang diuji berupa absorpsi : HIA (%) dan Caco-2 (nm/sec), distribusi : PPB (%) dan BBB, serta toksisitas : mutagen dan karsinogen. Toksisitas mutagenik dilakukan dengan Hit yang dikonfirmasi tes AMES. Sedangkan karsinogenik berdasarkan hewan uji mencit dan tikus. Hasil yang baik, keduanya negatif. Senyawa uji yang memenuhi HIA adalah Bruceajavanin A (99.360451) dan Canthine-6-one (98.824755), tidak ada yang memenuhi batas CaCO₂, PPB terpenuhi oleh Bruceajavanin A (90.240327) dan Canthine-6-one (94.392291), mutagen positif hanya Canthine-6-one, serta tidak ada senyawa uji yang sepenuhnya negatif karsinogenik.

Tabel 3 memperlihatkan hasil Visualisasi dan Molecular Docking menunjukkan senyawa uji dengan energi bebas Gibbs (ΔG_{bind}). Binding energy adalah kekuatan interaksi antara dua molekul atau lebih. Semakin besar nilai binding energy, maka afinitas antara reseptor dengan ligan akan semakin rendah. Namun sebaliknya, semakin rendah nilai binding energy maka afinitas antara reseptor dengan ligan akan semakin tinggi (9). Senyawa uji dengan energi bebas Gibbs (ΔG_{bind}) terkecil adalah Bruceolide, yakni sebesar -8,08.

Gambar 1 memperlihatkan hasil pengujian farmakofor menunjukkan grafik AUC ukuran yang akan mengukur kinerja pengklasifikasian dan diterapkan untuk metode perbandingan. AUC dapat dihitung sebagai jumlah dari semua persegi panjang yang dibentuk oleh sensitivitas dan spesifisitas dengan nilai untuk ambang batas yang berbeda. Nilai AUC yang kurang dari 0,50 menunjukkan bahwa senyawa inaktif lebih tinggi dibandingkan senyawa aktif yang dikenal software (6). Grafik AUC pada model 4 memiliki nilai AUC tertinggi yang mendekati 1 yaitu 0,91.

Tabel 4 memperlihatkan hasil pengujian farmakofor. Jika nilai fit score farmakofor >50% artinya fitur memiliki keaktifan yang baik. Sedangkan, fitur dari senyawa tersebut dianggap memiliki aktivitas yang kurang apabila nilai fitscore farmakofornya berada dikisaran 35-50%. Rentang nilai skor fit farmakofor berkaitan dengan tingkat keaktifan fitur senyawa terhadap reseptor (Muchtaridi et al., 2017). Senyawa yang aktif pada reseptor yaitu pada model 1 adalah Bruceine D dengan Fit-score = 45,06, model 2 adalah Bruceine B dengan Fit-score = 44,76, model 3 adalah Bruceolide dengan Fit-score = 44,76 dan model 4 adalah Bruceine A dengan Fit-score = 43,24. grafik AUC pada model 4 memiliki nilai AUC tertinggi yang mendekati 1 yaitu 0.91.

Tabel 5 memperlihatkan hasil rata-rata% kematian pengujian BSLT metode microplate dan vial. Hasil Metode Microplate pada konsentrasi 51,648 rata-rata kematian adalah 26,765%, konsentrasi 103,296 rata-rata kematian adalah 16,48%, konsentrasi 224,808 rata-rata kematian adalah 48,79%, konsentrasi 430,4 rata-rata kematian adalah 77,95%, konsentrasi 860,8 rata-rata kematian adalah 86,29%, konsentrasi 1721,6 rata-rata kematian adalah 96,67%. Hasil Metode Vial pada konsentrasi 51,648 rata-rata kematian adalah 30% dan konsentrasi 103,296 rata-rata kematian adalah 56,67%. Terjadi rata-rata kematian adalah 100% pada konsentrasi 223,808; 430,4; 860,8; 1721,6 dan 3443,2.

Gambar 2 memperlihatkan Kurva hasil Log konsentrasi pengujian BSLT metode microplate dan vial. Berdasarkan literatur yang ditemukan, ekstrak etanol buah makassar

dilakukan uji metode BSLT dengan hasil uji diperoleh nilai LC50 ekstrak etanol adalah 215 µg/mL (Setiawan, 2004). Dari hasil pengujian kelompok kami, didapatkan nilai LC50 untuk ekstrak air buah makassar sebesar 222.28 ppm (Medium Toxic) untuk teknik makro menggunakan vial serta nilai LC50 sebesar 47.04 ppm (Highly Toxic) untuk teknik mikro menggunakan microplate. Perbedaan hasil antara teknik vial dan teknik microplate tersebut dapat dikarenakan akibat tidak seragamnya jumlah larva uji yang dipakai pada kedua metode tersebut. Pada metode vial larva yang digunakan pada masing-masing vial tepat 10 ekor tetapi pada metode microplate larva yang digunakan cenderung lebih banyak yaitu di antara 10-20 ekor.

KESIMPULAN

Senyawa buah Makassar yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker berdasarkan metode pengujian RO5 adalah Bruceine B, Bruceine D, dan Canthine-6-one. Canthine-6-one merupakan satu-satunya senyawa yang tidak memenuhi ADME, tetapi non-mutagen. Bruceolide memiliki nilai Binding Energy terbesar -8,08 kkal/mol berdasarkan penambatan molekuler dan Bruceine D memiliki nilai fit score terbesar 45,06 berdasarkan skrining farmakofor. Sedangkan, hasil uji toksisitas menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) mendapatkan hasil LC50 pada 198.07 ppm metode microplate dan 82.22 ppm metode vial.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) Andi Mushawwir. 2014. Biokimia Nutrisi. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Sumedang.
- (2) Arba, M. 2019. Buku Ajar Farmasi Komputasi. Yogyakarta : Deepublish.
- (3) Arba, M., Arfan, Trisnawati, A., dan Kurniawati, D. 2020. Pemodelan Farmakofor untuk Identifikasi Inhibitor Heat Shock Proteins90 (HSP-90). Jurnal Farmasi Galenika. Vol. 6(2) : 229-236.
- (4) Arba, M., Nur-Hidayat, A., Surantaadmaja, S. I., dan Tjahjono, D. H. 2018. Pharmacophore-based Virtual Screening for Identifying $\beta 5$ Subunit Inhibitor of 20S Proteasome. Computational Biology and Chemistry. Vol. 77 : 64-71.
- (5) Arafah, A.B.R. and Notobroto, H.B., 2017. Faktor yang Berhubungan Dengan Perilaku Ibu Rumah Tangga Melakukan Pemeriksaan Payudara Sendiri (SADARI). The Indonesian Journal of Public Health, 12(2), pp.143–153.
- (6) Braga, A., Paes, F., Machado, S., Carta, M., Nardi, A., Silva, A., 2013. Comorbidity of Depression and Anxiety: Association with Poor Quality of Life in Type 1 and 2 Diabetic Patients. Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health. 9: 136-141.
- (7) Jia L, Song Q, Zhou C, Li X, Pi L, Ma X, Li H, Lu X, Shen Y. 2016. Dihydroartemisinin as a Putative STAT3 Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Targeting Jak2/STAT3 Signaling. PLoS One. Vol. 11(1).
- (8) Kaffi S, Subekti, dan Zulfahmi. 2011. Penggunaan Minyak dari Buah makasar (Brucea Javanica(L.) Merr.) sebagai Feed Additive Organik pada Broiler. Laporan Penelitian Hibah Bersaing (Bidang Pertanian).
- (9) Kastritis PL and Bonvin AMJJ. 2012. On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. Journal of The Royal Society Interface 10: 20120835.

- (10) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Situasi penyakit kanker. Jakarta: Kemenkes RI; 2015.
- (11) Kumalo, H. M., dan Soliman, M. E. 2015. Per-Residue Energy Footprints-Based Pharmacophore Modeling as an Enhanced in Silico Approach in Drug Discovery: A Case Study on the Identification of Novel b-Secretase 1 (BACE1) Inhibitors as AntiAlzheimer Agents. *Cell. Mol. Bioeng.* Vol. 9(1) : 175-189.
- (12) Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughlin, J.L., (1982), Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica.* 45:31-34.
- (13) Pratama, M. R. F. 2016. Studi in silico Metabolit Sekunder *Brucea javanica* sebagai Inhibitor EGFR Mutan T790M-L858R- V948R. Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian. Banjarmasin.
- (14) Rekha, U. V., Anita, M., Bhuminathan, S., dan Sadhana, K. 2020. Molecular docking analysis of human JAK2 with compounds from tomatoes. *Bioinformation.* Vol. 16(10) : 742-747.
- (15) Ravindranath, P. A., Forli, S., Goodsell, D. S., Olson, A. J., & Sanner, M. F. (2015). AutoDockFR: Advances in Protein-Ligand Docking with Explicitly Specified Binding Site Flexibility. *PLOS Computational Biology*, 11(12), e1004586.
- (16) Sen M, Pollock NI, Black J, DeGrave KA, Wheeler S, Freilino ML, Joyce S, Lui VW, Zeng Y, Chiosea SI, Grandis JR. 2015. JAK Kinase Inhibition Abrogates STAT3 Activation and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumor Growth. *Neoplasia.* Vol. 17(3) : 256-264.
- (17) Trott, O., & Olson, A. 2009. Software news and update autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 0, 1-7.
- (18) Zhao, J., Cao, Y., & Zhang, L. (2020). Exploring the Computational Methods for Protein-Ligand Binding Site Prediction. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 8, 417-426.